

Technische Universität Dresden

Fakultät Maschinenwesen

# **Synthese von Galactooligosacchariden in Süß- und Sauermolke**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor-Ingenieur  
(Dr.-Ing.)

vorgelegt von

M.Sc. Christin Fischer

geboren am 23.06.1986 in Leipzig

Tag der Einreichung: 22.07.2019

Tag der Verteidigung: 16.10.2020

Gutachter:

Prof. Dipl.-Ing. Dr. rer. nat. techn. habil. Harald Rohm, Technische Universität Dresden

Prof. Dr.-Ing. Thomas Kleinschmidt, Hochschule Anhalt

Prof. Dr.-Ing. Reinhard Kohlus, Universität Hohenheim



## TEILE DIESER ARBEIT WURDEN VERÖFFENTLICHT:

### Wissenschaftliche Paper:

- [CF1] **C. Fischer**, T. Kleinschmidt (2021). Synthesis of galactooligosaccharides by *Cryptococcus laurentii* and *Aspergillus oryzae* using different kinds of acid whey. *International Dairy Journal*, 112, Article 104867. doi: 10.1016/j.idairyj.2020.104867. Copyright © 2020 Elsevier Ltd.
- [CF2] **C. Fischer**, T. Kleinschmidt (2019). Effect of glucose depletion during the synthesis of galactooligosaccharides using a trienzymatic system. *Enzyme and Microbial Technology*, 121, 45-50. doi: 10.1016/j.enzmictec.2018.10.009. Copyright © 2018 Elsevier Inc.
- [CF3] **C. Fischer**, T. Kleinschmidt (2018). Combination of two  $\beta$ -galactosidases during the synthesis of galactooligosaccharides may enhance yield and structural diversity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 506 (1), 211-215. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.10.091. Copyright © 2018 Elsevier Inc.
- [CF4] **C. Fischer**, T. Kleinschmidt (2018). Synthesis of Galactooligosaccharides in Milk and Whey: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17 (3), 678-697. doi: 10.1111/1541-4337.12344. Copyright © 2018 Institute of Food Technologists® published by Wiley.
- [CF5] **C. Fischer**, T. Kleinschmidt (2015). Synthesis of galactooligosaccharides using sweet and acid whey as a substrate. *International Dairy Journal*, 48, 15-22. doi: 10.1016/j.idairyj.2015.01.003. Copyright © 2015 Elsevier Ltd.

**Hinweis:** Die Erlaubnis zur Wiederverwendung von Auszügen (Abbildungen, Tabellen) aus den genannten Artikeln im Rahmen dieser Dissertation wurde von Elsevier und John Wiley and Sons via RightsLink® eingeholt bzw. ist durch die jeweiligen Lizenzvereinbarungen (*Journal Publishing Agreement* (Elsevier) bzw. *Copyright Transfer Agreement* (Wiley)) geregelt. Der Verweis erfolgt an entsprechender Stelle unter Nutzung der oben angegebenen Referenznummern (CF1-CF5). Alle Abbildungen und Tabellen wurden gegenüber den publizierten Versionen hinsichtlich Sprache und/oder Farbe bzw. Layout modifiziert. Dies ist nicht gesondert kenntlich gemacht. Inhaltliche Änderungen werden als „modifiziert“ zusätzlich gekennzeichnet.

### Patente:

**C. Fischer**, T. Kleinschmidt, E. Weichhard, W. Fleischner (2018). Beta-Galactosidase aus *L. bulgaricus* zur Synthese von Galactooligosacchariden in Molke. Aktenzeichen EP18185038.9, Anmeldung beim Europäischen Patentamt am 23.7.2018.

### Konferenzbeiträge:

**C. Fischer**, T. Kleinschmidt (2018). Kombination mehrerer  $\beta$ -Galactosidasen zur Synthese von Galactooligosacchariden. Vortrag, GDL-Kongress Lebensmitteltechnologie, 11.-13.10.2018, Bremerhaven.

- C. Fischer,** T. Kleinschmidt (2018). Kombination mehrerer  $\beta$ -Galactosidasen zur Synthese von Galactooligosacchariden. Vortrag, 18. Nachwuchswissenschaftlerkonferenz, 6.6.2018, Köthen.
- C. Fischer,** T. Kleinschmidt (2018). GOS-Synthese in Sauermolke – ein Enzymvergleich. Poster, Jahrestreffen der ProcessNet-Fachgruppe Lebensmittelverfahrenstechnik, 5.-6.3.2018, Berlin.
- C. Fischer,** T. Kleinschmidt (2017). Synthesis of GOS in Greek yogurt whey using an acid-stable  $\beta$ -galactosidase from *Cryptococcus laurentii* with high transgalactosylation activity. Poster, 8<sup>th</sup> International Whey Conference, 17.-20.9.2017, Chicago.
- C. Fischer,** T. Kleinschmidt (2017). Synthese von  $\beta$ -Galactosidase aus *Lactobacillus bulgaricus* unter kosher/halal-Bedingungen. Poster, Jahrestreffen der ProcessNet-Fachgruppe Lebensmittelverfahrenstechnik, 14.-15.2.2017, Bruchsal.
- C. Fischer,** T. Kleinschmidt (2015). Effekt von Glucose-Oxidase auf die GOS-Ausbeute. Poster, Jahrestreffen der ProcessNet-Fachgruppe Lebensmittelverfahrenstechnik mit Lebensmittelbiotechnologie, 16.-17.3.2015, Magdeburg.
- C. Fischer,** T. Kleinschmidt (2014). Galactooligosaccharide synthesis in sweet and acid whey. Kurzvortrag, 7<sup>th</sup> International Whey Conference, 7.-9.9.2014, Rotterdam.
- C. Fischer,** T. Kleinschmidt (2014). Galactooligosaccharide synthesis in sweet and acid whey. Poster, 7<sup>th</sup> International Whey Conference, 7.-9.9.2014, Rotterdam.
- C. Fischer,** A. Krause, T. Kleinschmidt (2014). Verwendung von Molke als Substrat zur enzymatischen GOS-Synthese. Vortrag, 15. Nachwuchswissenschaftlerkonferenz, 24.4.2014, Magdeburg.
- C. Fischer,** A. Krause, T. Kleinschmidt (2014). Synthese von Galactooligosacchariden in Molke. Vortrag, Jahrestreffen der ProcessNet-Fachgruppen Lebensmittelverfahrenstechnik und Phytoextrakte, 26.-28.2.2014, Freising/Weihenstephan.



## Kurzfassung

Die vorliegende Arbeit hatte vorrangig zum Ziel, die enzymatische Synthese von prebiotischen Galactooligosacchariden (GOS) in Süß- und Sauermolke unter Nutzung verschiedener Enzymquellen zu evaluieren. Aufgrund des tendenziell weltweit steigenden Molkenaufkommens besteht großes Interesse, eine möglichst ganzheitliche Wertschöpfung dieses teilweise ungenutzten Rohstoffs zu generieren. Eine Möglichkeit, um dies zu realisieren, wäre die Herstellung einer GOS-haltigen Molke und eine entsprechende Weiterverarbeitung zu GOS-haltigen Lebensmitteln. Durch die generell hohe Temperatur- und pH-Toleranz von GOS sind vielfältige Applikationsmöglichkeiten gegeben.

Neben den kommerziell verfügbaren  $\beta$ -Galactosidasen aus *Aspergillus oryzae* und *Kluyveromyces lactis* wurden Enzyme aus *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (kurz: *L. bulgaricus*) und *Cryptococcus laurentii* im Labormaßstab hergestellt und charakterisiert. Mit beiden Enzymen konnten höhere GOS-Ausbeuten in niedrig konzentrierten Lactoselösungen (Puffer als auch Molke) erhalten werden als mit den beiden kommerziellen Enzymen. Während die  $\beta$ -Galactosidase aus *K. lactis* stark vom umgebenden Medium beeinflusst wird, so zeigen alle anderen Enzyme eine gute Übertragbarkeit der Ergebnisse von Puffer auf das Substrat Süß- bzw. Sauermolke. Die höchste Transgalactosylierungsaktivität weist das Enzym aus *C. laurentii* mit Ausbeuten von ca. 50 % (inkl. GOS-Disaccharide) auf. Bei Verwendung der *L. bulgaricus*-Lactase können die Gesamtausbeute als auch die GOS-Zusammensetzung in Abhängigkeit von der gewählten Synthesetemperatur gezielt beeinflusst werden.

Des Weiteren wurde der Einfluss einer parallel zur Synthese stattfindenden Glucose-Entfernung durch enzymatische Oxidation untersucht. Trotz tendenziell begünstigter Synthese von Tri- und höheren Oligosacchariden konnte die Ausbeute mit *A. oryzae* nicht signifikant gesteigert werden. Die Kopplung mit *K. lactis* führte zu einer signifikant verringerten Synthese von GOS-Disacchariden, wodurch die Ausbeute insgesamt sank. Der Einsatz von Glucose-Oxidase und Katalase ist demnach nur bei  $\beta$ -Galactosidasen empfehlenswert, welche vorrangig Tri- und kaum Disaccharide synthetisieren.

Der Einsatz mehrerer  $\beta$ -Galactosidase-Enzyme stellte sich als vielversprechend heraus. In Abhängigkeit von den jeweils kombinierten Enzymen konnte die Ausbeute teilweise gesteigert werden. Positiv erwies sich eine sequentielle Kombination von *A. oryzae* und *K. lactis* im Sinne der Steigerung der Gesamtausbeute und der parallele Einsatz von *A. oryzae* und *C. laurentii* im Sinne der Erhöhung der Strukturdiversität der GOS-Mischung.

## Abstract

The prior aim of the present work was to study the synthesis of prebiotic galactooligosaccharides (GOS) in sweet and acid whey by using various enzyme origins. Worldwide, an increase in whey production can be observed, thus a complete usage of this partially wasted resource is preferable. This could be implemented by producing a GOS containing whey and its subsequent processing to GOS containing foods. Due to the high temperature stability over a wide pH range, manifold food applications are possible.

Besides the commercial available  $\beta$ -galactosidases from *Aspergillus oryzae* and *Kluyveromyces lactis*, enzymes from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (short: *L. bulgaricus*) and *Cryptococcus laurentii* were produced on the laboratory scale and characterized accordingly. With both enzymes, higher GOS yields in low lactose solutions (buffer as well as whey) were achieved compared to the two commercial enzymes. While the  $\beta$ -galactosidase from *K. lactis* was strongly influenced by the surrounding environment, all other tested enzymes showed a good transferability of the results from buffer to sweet and acid whey, respectively. The enzyme from *C. laurentii* exhibited the highest affinity to transgalactosylation, the yield being about 50 % (including GOS disaccharides). When using the *L. bulgaricus* lactase, total GOS yield as well as GOS composition can be adjusted via the synthesis temperature.

Furthermore, the effect of glucose depletion during GOS synthesis using enzymatic oxidation was examined. Although a tendency towards the synthesis of tri- and higher oligosaccharides was observed, GOS yield by *A. oryzae* was not significantly enhanced. The combination with the *K. lactis* enzyme led to a significantly reduced synthesis of GOS disaccharides, resulting in a decreased total GOS yield. Thus, the use of glucose oxidase and catalase is only beneficial for  $\beta$ -galactosidases, which have a preference for synthesizing trisaccharides, but less disaccharides.

The use of more than one  $\beta$ -galactosidase has shown to be promising. Depending on the respective enzyme combinations, it was partially possible to enhance the GOS yield. Positive results in terms of increasing total GOS yield were obtained using a consecutive coupling of *A. oryzae* and *K. lactis*, while in terms of enhancing the structural diversity of the GOS mixture, a simultaneous combination of *A. oryzae* und *C. laurentii* led to the best results.

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Februar 2013 bis Juni 2019 am Fachbereich für Angewandte Biowissenschaften und Prozesstechnik der Hochschule Anhalt im Rahmen eines kooperativen Promotionsverfahrens an der Technischen Universität Dresden.

Ich danke insbesondere Prof. Dr. Thomas Kleinschmidt (Hochschule Anhalt) für die Bereitstellung des sehr interessanten Themas, die Übernahme des Gutachtens und die Möglichkeit zu publizieren.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Harald Rohm (Technische Universität Dresden) für die Unterstützung meiner Promotion, seinen kritischen Blick für die Details und die Übernahme der Gutachtertätigkeit.

Ebenso danke ich Prof. Dr. Reinhard Kohlus (Universität Hohenheim) für die Erstellung des dritten Gutachtens und seinen Einsatz als Prüfer.

Prof. Dr. Thomas Walther danke ich für die Übernahme des Vorsitzes sowie Prof. Dr. Thomas Henle und PD Dr. Doris Jaros für Ihre Mitwirkung in der Promotionskommission.

Ich danke dem Fachbereichsrat des FB7 der Hochschule Anhalt für die finanzielle Unterstützung durch die Bewilligung der Promotionsstelle vom September 2013 bis August 2017. Ich möchte mich an dieser Stelle auch für die Erfahrungen bedanken, die ich seit März 2014 als Mitglied in diesem Gremium sammeln durfte.

Mein ganz besonderer Dank geht an Claudia Bartkowiak für die vielen Gespräche, ihr stets offenes Ohr, ihre Anregungen und motivierenden Worte und vor allem für das sorgfältige Korrekturlesen von großen Teilen dieser Arbeit.

Ich möchte mich auch bei „meiner Frühstücksrunde“ bedanken, die mich so herzlich in ihren Kreis aufgenommen hat. Ilona Jawinski danke ich für unsere Gespräche über analytische Themen jeglicher Art und für unsere kurzweiligen, gemeinsamen Zugfahrten Richtung Heimat.

Meinen Kollegen der Lebensmitteltechnologie danke ich für die entspannte Arbeitsatmosphäre und für den kollegialen Zusammenhalt und die Hilfsbereitschaft bei den alltäglichen und nicht-alltäglichen Herausforderungen des Arbeitslebens.

Ich danke weiterhin den Kollegen der Biotechnologie für ihre zum Teil sehr kurzfristige Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei biotechnologischen Fragestellungen. Insbesondere danke ich Sabine Grabner für ihre Anregungen zu meinen mikrobiologischen Sorgen und Nöten.

Meiner ehemaligen Master-Studentin Sandra Schube danke ich für die Unterstützung bei den Versuchen zur Enzymstabilität.

Ich danke meiner Familie – insbesondere Claudia Fischer und Anke Bächtiger – für ihre stete Unterstützung, ihren Glauben an mich und ihre aufmunternden Worte in besonders turbulenten Zeiten. Danke!



# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGS- UND SYMBOLVERZEICHNIS.....</b>	<b>IV</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>VIII</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS.....</b>	<b>XIII</b>
<b>1 EINLEITUNG UND ZIELSTELLUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2 STAND DES WISSENS .....</b>	<b>4</b>
2.1 Molke: Aufkommen, Inhaltsstoffe und Verwertungsmöglichkeiten .....	4
2.2 $\beta$ -Galactosidasen .....	7
2.2.1 Aufbau und Eigenschaften.....	7
2.2.2 Inhibitoren und Aktivatoren in Milch und Molke .....	8
2.2.3 Einfluss von Glucose und Galactose .....	9
2.2.4 Kommerzielle $\beta$ -Galactosidase-Präparate .....	11
2.3 Galactooligosaccharide .....	12
2.3.1 Definition und Syntheseweg.....	12
2.3.2 Einflussgrößen auf die Reaktion .....	14
2.3.2.1 Enzymquelle.....	14
2.3.2.2 Lactosekonzentration .....	16
2.3.2.3 Reaktionsbedingungen .....	17
2.3.2.4 Einfluss von Glucose und Galactose.....	21
2.3.3 GOS-Synthese in Milch und Molke .....	22
2.3.4 GOS-Synthese mit <i>Lactobacillus</i> sp.....	26
2.3.5 GOS-Synthese mit <i>Cryptococcus laurentii</i> .....	26
2.3.6 GOS-Synthese mit mehreren $\beta$ -Galactosidasen .....	27
2.3.7 Möglichkeiten der Glucose-Entfernung.....	27
2.3.8 Kommerziell erhältliche GOS-Produkte.....	28
2.3.9 Eigenschaften und Anwendung .....	30
2.3.10 Modifizierte GOS-Strukturen und GOS-Alternativen.....	32
<b>3 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>40</b>
3.1 Materialien.....	40
3.1.1 Verwendete Enzyme.....	40
3.1.2 Verwendete Mikroorganismen.....	40
3.1.3 Verwendete Molkeproben .....	40
3.1.4 Verwendete Geräte .....	40
3.2 Bestimmung der Inhaltsstoffe von Molke .....	40
3.3 Mikroorganismenkultivierung und Enzymgewinnung .....	41
3.3.1 Biochemische Analysenmethoden .....	41

3.3.2	Herstellung der Rohextrakte aus <i>Lactobacillus</i> sp.....	41
3.3.3	Kultivierung im Labormaßstab.....	42
3.3.3.1	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> LB4 .....	42
3.3.3.2	<i>Cryptococcus laurentii</i> .....	43
3.3.4	Kultivierung im Fermentormaßstab ( <i>L. bulgaricus</i> LB4) .....	43
<b>3.4</b>	<b>Assays zur Bestimmung der Enzymaktivität .....</b>	<b>43</b>
3.4.1	$\beta$ -Galactosidase .....	43
3.4.2	Glucose-Oxidase .....	44
3.4.3	Katalase .....	44
3.4.4	Berechnung der Enzymaktivität.....	45
<b>3.5</b>	<b>Enzymcharakterisierung .....</b>	<b>45</b>
3.5.1	Temperatur- und pH-Optimum .....	45
3.5.2	Bestimmung von Aktivatoren und Inhibitoren .....	46
3.5.3	Enzymstabilität .....	46
<b>3.6</b>	<b>Galactooligosaccharid-Synthese .....</b>	<b>47</b>
3.6.1	Verwendung von kommerziellen $\beta$ -Galactosidasen .....	47
3.6.2	Verwendung von $\beta$ -Galactosidase aus <i>Lactobacillus bulgaricus</i> LB4.....	47
3.6.3	Verwendung von <i>Cryptococcus laurentii</i> -Zellen .....	47
3.6.4	Kopplung mit Glucose-Oxidase und Katalase .....	48
3.6.5	Kopplung mehrerer $\beta$ -Galactosidasen .....	48
<b>3.7</b>	<b>Galactooligosaccharid-Analytik.....</b>	<b>49</b>
<b>3.8</b>	<b>Statistische Auswertung .....</b>	<b>50</b>
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION .....</b>	<b>51</b>
<b>4.1</b>	<b>Zusammensetzung der Molken.....</b>	<b>51</b>
<b>4.2</b>	<b>Charakterisierung der <math>\beta</math>-Galactosidasen .....</b>	<b>52</b>
4.2.1	Temperatur- und pH-Optimum .....	52
4.2.2	Inhibitoren und Aktivatoren .....	55
4.2.3	Stabilität in Puffer und Molke.....	57
<b>4.3</b>	<b>Synthese von Galactooligosacchariden .....</b>	<b>61</b>
4.3.1	Synthese mit $\beta$ -Galactosidase aus <i>K. lactis</i> .....	61
4.3.1.1	Synthese in Puffer .....	61
4.3.1.2	Synthese in Süßmolke .....	64
4.3.1.3	Synthese in Sauermolke.....	66
4.3.2	Synthese mit $\beta$ -Galactosidase aus <i>A. oryzae</i> .....	67
4.3.2.1	Synthese in Puffer .....	67
4.3.2.2	Synthese in Süßmolke .....	69
4.3.2.3	Synthese in Sauermolke.....	70
4.3.3	Synthese mit $\beta$ -Galactosidase aus <i>L. bulgaricus</i> LB4 .....	73
4.3.3.1	Synthese in Puffer .....	73
4.3.3.2	Synthese in Süßmolke .....	76
4.3.4	Synthese mit <i>C. laurentii</i> -Zellen.....	78
4.3.4.1	Synthese in Puffer .....	78

4.3.4.2	Synthese in Sauermolke .....	80
4.3.5	Vergleich der untersuchten Enzyme und Substrate .....	83
4.3.6	Kopplung mit Glucose-Oxidase und Katalase .....	88
4.3.6.1	Charakterisierung von Glucose-Oxidase und Katalase .....	88
4.3.6.2	Einfluss simultaner Glucose-Entfernung auf die GOS-Ausbeute .....	90
4.3.6.3	Schlussfolgerungen .....	95
4.3.7	Kombination mehrerer $\beta$ -Galactosidasen .....	95
4.3.7.1	Kopplung von <i>A. oryzae</i> und <i>K. lactis</i> .....	95
4.3.7.2	Kopplung von <i>A. oryzae</i> und <i>C. laurentii</i> .....	100
4.3.7.3	Schlussfolgerungen .....	105
<b>4.4</b>	<b>Untersuchungen zur <math>\beta</math>-Galactosidase-Synthese mit <i>L. bulgaricus</i> LB4 .....</b>	<b>106</b>
4.4.1	Nährmedienumstellung auf kosher-/halal-zertifizierte Bestandteile .....	106
4.4.2	Kultivierung im Fermentormaßstab .....	111
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK .....</b>	<b>114</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>118</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>140</b>
<b>7.1</b>	<b>Anhang zu Kapitel 2 .....</b>	<b>140</b>
<b>7.2</b>	<b>Anhang zu Kapitel 3 .....</b>	<b>165</b>
7.2.1	Verwendete Geräte .....	165
7.2.2	Zusammensetzung MRS-Medium .....	166
7.2.3	Wachstum von <i>C. laurentii</i> .....	167
7.2.4	Anfangslactosekonzentrationen .....	167
7.2.5	Katalaseaktivität .....	168
7.2.6	Vergleich GOS-Disaccharidanalytik .....	169
<b>7.3</b>	<b>Anhang zu Kapitel 4 .....</b>	<b>170</b>
7.3.1	Temperaturabhängigkeit von verschiedenen $\beta$ -Galactosidasen .....	170
7.3.2	Aktivatoren und Inhibitoren .....	171
7.3.3	Grafiken zur $\beta$ -Galactosidase-Stabilität .....	173
7.3.4	Katalase-Stabilität .....	182
7.3.5	Aminosäuresequenz von $\beta$ -Galactosidase aus <i>L. bulgaricus</i> LB4 .....	183
7.3.6	Grafiken zur GOS-Synthese mit kommerziellen $\beta$ -Galactosidasen .....	184
7.3.7	Grafiken zur GOS-Synthese mit $\beta$ -Galactosidase aus <i>L. bulgaricus</i> LB4 .....	188
7.3.8	Daten zur GOS-Synthese mit $\beta$ -Galactosidase aus <i>C. laurentii</i> .....	190
7.3.9	Vergleich der maximalen GOS-Ausbeute in Puffer und Molke .....	191
7.3.10	Grafik zur GOS-Synthese mit $\beta$ -Galactosidase/GOX/KAT .....	192
7.3.11	Grafiken zur GOS-Synthese mit mehreren $\beta$ -Galactosidasen .....	193
7.3.12	Grafiken zur Kultivierung von <i>L. bulgaricus</i> LB4 .....	194

## Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

### Abkürzungen

AN	$\alpha$ -Aminostickstoff (engl. <i>amino nitrogen</i> )
ATCC	American Type Culture Collection
BMOS	bovine Milcholigosaccharide
BTM	Biotrockenmasse
BSB	biologischer Sauerstoffbedarf
BSB <sub>5</sub>	biologischer Sauerstoffbedarf in 5 Tagen
CMP	Caseinmakropeptid
CP	Caseinpepton
CSB	chemischer Sauerstoffbedarf
D/A	molares Donor/Akzeptor-Verhältnis
DH	Hydrolysegrad (engl. <i>degree of hydrolysis</i> )
DP	Polymerisationsgrad (engl. <i>degree of polymerization</i> )
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
E/S	Enzym/Substrat-Verhältnis
EA	Enzymaktivität
EC	Enzyme Commission
EFSA	Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (engl. <i>European Food Safety Authority</i> )
FL	Fucosyllactose (2'-FL, 3'-FL)
FOS	Fructooligosaccharide
FP	Fleischpepton
Fuc	Fucose
Gal	Galactose
GalNAc	N-Acetylgalactosamin
Glc	Glucose
Glc/Gal	Glucose/Galactose-Faktor als Maß für die Transgalactosylierungsaffinität
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
GL	Galactosyllactose (3'-GL, 4'-GL, 6'-GL)
GOS	Galactooligosaccharide



GOS/Gal	GOS/Galactose-Faktor als Maß für die Transgalactosylierungsaffinität
GOS/reactLac	GOS/umgesetzte Lactose-Verhältnis als Maß für die Transgalactosylierungsaffinität
GOX	Glucose-Oxidase
GRAS	allgemein als sicher eingestuft (engl. <i>generally recognized as safe</i> )
HE	Hefeextrakt
HeOS	Heterooligosaccharide
HMOS	humane Milcholigosaccharide
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. <i>high performance liquid chromatography</i> )
I/S	molares Inhibitor/Substrat-Verhältnis
ILC	Anfangslactosekonzentration (engl. <i>initial lactose concentration</i> )
KAT	Katalase
LNnT	Lacto-N-Neotetraose
LNT2	Lacto-N-triose II
MO	Mikroorganismus
MRS	Kulturmedium nach deMan, Rogosa und Sharpe
MWCO	Trenngrenze (engl. <i>molecular weight cut-off</i> )
NDA	EFSA-Gremium für Ernährung, neuartige Lebensmittel und Lebensmittelallergene (engl. <i>Panel on Dietetic Products, Nutrition, and Allergies</i> )
Neu5Ac	N-Acetylneuraminsäure (auch: Sialinsäure)
Neu5Gc	N-Glycolylneuraminsäure
NPN	Nicht-Protein-Stickstoff (engl. <i>non-protein nitrogen</i> )
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei 600 nm
oNPG	o-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid
OPA	ortho-Phthaldialdehyd
OS	Oligosaccharid(e)
otg	in Zusammenhang mit %-Angaben, Prozent der Gesamt-GOS (engl. <i>of total GOS</i> )
ots	in Zusammenhang mit %-Angaben, Prozent der Gesamt-Zucker (engl. <i>of total sugar</i> )
PEM	Phosphat-EDTA-Magnesium (Puffer)
PES	Polyethersulfon
PDCAAS	Aminosäureindex (engl. <i>Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score</i> )
pNPG	p-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid

RI	Brechungsindex (engl. <i>refractive index</i> )
RT	Raumtemperatur
RZA	Raum-Zeit-Ausbeute
S/I	molares Substrat/Inhibitor-Verhältnis
SL	Sialyllactose (3'-SL, 6'-SL)
SP	Sojapepton
TLC	Dünnschichtchromatographie (engl. <i>thin layer chromatography</i> )
TM	Trockenmasse
TN	Gesamt-Stickstoff (engl. <i>total nitrogen</i> )
UF	Ultrafiltration
UHT	Ultrahocherhitzung (engl. <i>ultra-high temperature</i> )
VF	Verdünnungsfaktor
WPC	Molkenproteinkonzentrat (engl. <i>whey protein concentrate</i> )
WPI	Molkenproteinisolat (engl. <i>whey protein isolate</i> )

## Symbole

c	[g/L]	Konzentration
E	[1/cm]	Extinktion
E <sub>d</sub>	[kJ/mol]	Deaktivierungsenergie
k <sub>0</sub>	[1/min]	Häufigkeitsfaktor
k <sub>d</sub>	[1/min]	Geschwindigkeitskonstante der Inaktivierung
K <sub>i</sub>	[mmol/L]	Inhibitor-Konstante
K <sub>m</sub>	[mmol/L]	Michaelis-Menten-Konstante
R	[J/mol·K]	universelle Gaskonstante
t	[min]	Zeit
t <sub>1/2</sub>	[min]	Halbwertszeit
T	[°C]	Temperatur
V	[L]	Volumen
Y <sub>GOS</sub>	[%]	GOS-Ausbeute

$Y_{PX}$	[U/g <sub>BTM</sub> ]	Produktausbeute (P) bezogen auf die Biotrockenmasse (X)
$Y_{PrX}$	[mg/g <sub>BTM</sub> ]	Proteinausbeute (Pr) bezogen auf die Biotrockenmasse (X)
$\epsilon$	[L/μmol·cm]	Extinktionskoeffizient
$\mu_{max}$	[1/h]	maximale spezifische Wachstumsrate
$\pi_{E,t}$	[mgGOS/U·h]	auf die Reaktionszeit bezogene enzymatische Produktivität zum Zeitpunkt der maximalen GOS-Ausbeute

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 2-1:</b> Eingesetzte Milchmenge (blau) für die Herstellung von Milchprodukten (rot) und daraus resultierender Molkenanfall (grün) in Deutschland (2017), Daten aus [27] .....	6
<b>Abbildung 2-2:</b> Vereinfachte schematische Darstellung der GOS-Synthese .....	12
<b>Abbildung 2-3:</b> GOS-Ausbeute in Abhängigkeit von der eingesetzten Lactosekonzentration und Enzymquelle .....	16
<b>Abbildung 2-4:</b> GOS-Ausbeute in Abhängigkeit vom Lactoseumsatz zum Zeitpunkt der maximalen Ausbeute in verschiedenen Substraten der Molkereiindustrie und Puffern .....	23
<b>Abbildung 2-5:</b> Strukturen (Beispiele) humaner Milcholigosaccharide (HMOS). .....	33
<b>Abbildung 4-1:</b> Temperaturoptimum von $\beta$ -Galactosidase-Präparaten aus <i>K. lactis</i> (A) und <i>A. oryzae</i> (B) von verschiedenen Herstellern .....	53
<b>Abbildung 4-2:</b> pH-Optimum von $\beta$ -Galactosidasen aus <i>Lactobacillus</i> sp. (Rohextrakte) .....	53
<b>Abbildung 4-3:</b> Temperaturoptimum von $\beta$ -Galactosidasen aus <i>Lactobacillus</i> sp. (Rohextrakte) .....	54
<b>Abbildung 4-4:</b> pH- (A, bei 50°C) und Temperaturoptimum (B, in 50 mmol/L Mcllvaine-Puffer) der <i>C. laurentii</i> -Zellen .....	54
<b>Abbildung 4-5:</b> Arrhenius-Diagramm der $\beta$ -Galactosidase-Inaktivierung von <i>L. reuteri</i> LR92 in 50 mmol/L Na-Phosphat-Puffer (pH 6,0–7,0), Süßmolke pH 6,5 (39 g/L Lactose) und konzentrierter Süßmolke pH 6,5 (200 g/L Lactose) .....	58
<b>Abbildung 4-6:</b> Arrhenius-Diagramm der Inaktivierung von $\beta$ -Galactosidasen aus <i>K. lactis</i> und <i>Lactobacillus</i> sp. in Süßmolke pH 6,5 (39 g/L Lactose) .....	59
<b>Abbildung 4-7:</b> GOS-Ausbeute mit $\beta$ -Galactosidase aus <i>K. lactis</i> (optilactase LX2) in PEM-Puffer in Abhängigkeit von der Reaktionszeit (A) und dem Lactoseumsatz (B) .....	62
<b>Abbildung 4-8:</b> GOS-Synthese mit $\beta$ -Galactosidase aus <i>K. lactis</i> (optilactase LX2) in PEM-Puffer in Abhängigkeit von der Reaktionszeit. A: Substratverbrauch und Produktbildung. B: Bildungskinetik der einzelnen GOS-Fraktionen (DP = Polymerisationsgrad) .....	63
<b>Abbildung 4-9:</b> GOS-Ausbeute mit $\beta$ -Galactosidase aus <i>K. lactis</i> (optilactase LX2) in Süßmolke (ILC 39 g/L) und konzentrierter Süßmolke (ILC 100–300 g/L) in Abhängigkeit von der Reaktionszeit (A) und dem Lactoseumsatz (B) .....	65
<b>Abbildung 4-10:</b> GOS-Ausbeute mit $\beta$ -Galactosidase aus <i>K. lactis</i> (optilactase LX2) in Sauermolke (ILC 39 g/L) und konzentrierter Sauermolke (ILC 100–300 g/L) in Abhängigkeit von der Reaktionszeit (A) und dem Lactoseumsatz (B) .....	67
<b>Abbildung 4-11:</b> GOS-Ausbeute mit $\beta$ -Galactosidase aus <i>A. oryzae</i> in deion. Wasser (W, optilactase A50) und Mcllvaine-Puffer (P, Maxilact A4) in Abhängigkeit von der Reaktionszeit (A) und dem Lactoseumsatz (B) .....	68
<b>Abbildung 4-12:</b> GOS-Synthese mit $\beta$ -Galactosidase aus <i>A. oryzae</i> (optilactase A50) in deion. Wasser in Abhängigkeit von der Reaktionszeit. A: Substratverbrauch und Produktbildung. B: Bildungskinetik der einzelnen GOS-Fraktionen .....	69
<b>Abbildung 4-13:</b> GOS-Ausbeute mit $\beta$ -Galactosidase aus <i>A. oryzae</i> (optilactase A50) in Süßmolke (ILC 39 g/L) und konzentrierter Süßmolke (ILC 100–200 g/L) in Abhängigkeit von der Reaktionszeit (A) und dem Lactoseumsatz (B) .....	70
<b>Abbildung 4-14:</b> GOS-Ausbeute mit $\beta$ -Galactosidase aus <i>A. oryzae</i> (optilactase A50) in Sauermolke (ILC 39 g/L) und konzentrierter Sauermolke (ILC 100–200 g/L) in Abhängigkeit von der Reaktionszeit (A) und dem Lactoseumsatz (B) .....	71
<b>Abbildung 4-15:</b> GOS-Ausbeute mit $\beta$ -Galactosidase aus <i>A. oryzae</i> (Maxilact A4) in Abhängigkeit von der Reaktionszeit (A) und dem Lactoseumsatz (B) in verschiedenen Sauermolke-Proben .....	72
<b>Abbildung 4-16:</b> GOS-Synthese mit $\beta$ -Galactosidase aus <i>L. bulgaricus</i> LB4 (Rohextrakt) in 50 mmol/L Na-Phosphat-Puffer in Abhängigkeit von der Reaktionszeit. A: Substratverbrauch und Produktbildung. B: Bildungskinetik der einzelnen GOS-Fraktionen .....	73

<b>Abbildung 4-17:</b> Einfluss der Temperatur auf die GOS-Synthese mit $\beta$ -Galactosidase aus <i>L. bulgaricus</i> LB4 (Rohextrakt) in 50 mmol/L Na-Phosphat-Puffer in Abhängigkeit von der Reaktionszeit (A) und dem Lactoseumsatz (B) .....	74
<b>Abbildung 4-18:</b> Menge der gebildeten GOS-Fractionen DP2, DP3 und DP4 (A, % der Gesamtzucker) und Anteil der Fractionen an den Gesamt-GOS (B) in Abhängigkeit von der Synthesetemperatur .....	76
<b>Abbildung 4-19:</b> Einfluss der Temperatur auf die GOS-Synthese mit $\beta$ -Galactosidase aus <i>L. bulgaricus</i> LB4 (Rohextrakt) in Süßmolke in Abhängigkeit von der Reaktionszeit (A) und dem Lactoseumsatz (B) .....	77
<b>Abbildung 4-20:</b> GOS-Synthese mit <i>C. laurentii</i> -Zellen in 50 mmol/L McIlvaine-Puffer in Abhängigkeit von der Reaktionszeit. A: Substratverbrauch und Produktbildung. B: Bildungskinetik der einzelnen GOS-Fractionen .....	79
<b>Abbildung 4-21:</b> GOS-Ausbeute (links Achse) und Lactosekonzentration (rechte Achse) in Abhängigkeit von der Reaktionszeit bei Verwendung ganzer Zellen von <i>C. laurentii</i> unter Variation der anfänglichen Lactosekonzentration .....	80
<b>Abbildung 4-22:</b> GOS-Ausbeute in Abhängigkeit von der Reaktionszeit (A) und dem Lactoseumsatz (B) bei Verwendung ganzer Zellen von <i>C. laurentii</i> in verschiedenen Sauermolke-Proben (CM = Caseinmolke, GJM = Griechische Joghurt-Molke, SMPK = Sauermolkenpermeat-Konzentrat) und Puffer (nur in B).....	81
<b>Abbildung 4-23:</b> HPLC-Chromatogramme (Säule: Hi-Plex Na) zum Zeitpunkt der maximalen GOS-Ausbeute in Puffer, Caseinmolke, Griechischer Joghurt-Molke und konzentriertem Sauermolkenpermeat .....	82
<b>Abbildung 4-24:</b> Anteil der Fractionen an den Gesamt-GOS in Abhängigkeit vom verwendeten Substrat (GJ-Molke = Griechische Joghurt-Molke, konz. SMP = konzentriertes Sauermolkenpermeat) bei der GOS-Synthese mit <i>C. laurentii</i> .....	82
<b>Abbildung 4-25:</b> HPLC-Chromatogramm (Säule: Hi-Plex Na) der GOS-Fraktion (DP2–5) in Abhängigkeit von der verwendeten $\beta$ -Galactosidase .....	87
<b>Abbildung 4-26:</b> Abhängigkeit der Glucose-Oxidase (A)- und Katalase (B)-Aktivität in Units pro Gramm Pulver bzw. mL Lösung von der Temperatur .....	88
<b>Abbildung 4-27:</b> Glucose-Oxidase-Aktivität und -Stabilität bei Raumtemperatur in Units pro Gramm Pulver in Abhängigkeit vom pH-Wert .....	89
<b>Abbildung 4-28:</b> Arrhenius-Diagramm der Inaktivierung von Katalase aus <i>M. lysodeikticus</i> (Sigma Aldrich) bei pH 6,5 (PEM-Puffer) und pH 4,5 (Na-Acetat-Puffer) .....	89
<b>Abbildung 4-29:</b> Zeitlicher Verlauf von pH- (linke Achse, gestrichelte Linien) und pO <sub>2</sub> -Wert (rechte Achse, durchgezogene Linien) während der GOS-Synthese mit $\beta$ -Galactosidasen aus <i>A. oryzae</i> (blau) und <i>K. lactis</i> (rot) in Kombination mit Glucose-Oxidase/Katalase .....	90
<b>Abbildung 4-30:</b> GOS-Synthese mit $\beta$ -Galactosidase aus <i>A. oryzae</i> (Maxilact A4) mit (A) und ohne (B) parallele Glucose-Entfernung mittels Glucose-Oxidase/Katalase .....	91
<b>Abbildung 4-31:</b> GOS-Synthese mit $\beta$ -Galactosidase aus <i>K. lactis</i> (optilactase LX2) mit (A) und ohne (B) parallele Glucose-Entfernung mittels Glucose-Oxidase/Katalase .....	92
<b>Abbildung 4-32:</b> GOS-Ausbeute (linke Achse) und Lactoseumsatz (rechte Achse) mit <i>A. oryzae</i> (Maxilact A4) in Abhängigkeit von der Reaktionszeit bei pH 4,5 (offene Symbole) und pH 6,5 (geschlossene Symbole) ..	96
<b>Abbildung 4-33:</b> GOS-Ausbeute in Abhängigkeit von der Zeit (A) und dem Hydrolysegrad (B) bei Verwendung von <i>A. oryzae</i> (Maxilact A4) und <i>K. lactis</i> (optilactase LX2), sowie sequentieller (+, mit Inaktivierung des 1. Enzyms) und paralleler (&) Kopplung beider Enzyme.....	97
<b>Abbildung 4-34:</b> GOS-Zusammensetzung (DP = Polymerisationsgrad) in % des Gesamtzuckers in Abhängigkeit vom Hydrolysegrad bei alleiniger Synthese mit <i>K. lactis</i> (offene Symbole) sowie sequentieller Kopplung von <i>A. oryzae</i> (3 h, ca. 45 % Hydrolyse) und <i>K. lactis</i> (geschlossene Symbole).....	98
<b>Abbildung 4-35:</b> GOS-Zusammensetzung (DP = Polymerisationsgrad) in % des Gesamtzuckers in Abhängigkeit von der Reaktionszeit bei sequentieller Kopplung von <i>K. lactis</i> (0,5 h) und <i>A. oryzae</i> (0,5–2,5 h).....	99
<b>Abbildung 4-36:</b> GOS-Zusammensetzung (DP = Polymerisationsgrad) in % des Gesamtzuckers in Abhängigkeit von verschiedenen Enzymkombinationen .....	99

<b>Abbildung 4-37:</b> GOS-Ausbeute in Abhängigkeit von der Zeit (A) und dem Hydrolysegrad (B) bei Verwendung von <i>A. oryzae</i> (Maxilact A4) und <i>C. laurentii</i> (ganze Zellen), sowie sequentieller (C.I.+A.o., A.o.+C.I.) und paralleler (C.I.&A.o.) Kopplung beider Enzyme .....	100
<b>Abbildung 4-38:</b> GOS-Zusammensetzung (DP = Polymerisationsgrad) in % des Gesamtzuckers in Abhängigkeit vom Hydrolysegrad bei sequentieller Kopplung von <i>C. laurentii</i> (96 h, ca. 64 % Hydrolyse) und <i>A. oryzae</i> .....	101
<b>Abbildung 4-39:</b> GOS-Zusammensetzung (DP = Polymerisationsgrad) in % des Gesamtzuckers in Abhängigkeit vom Hydrolysegrad bei sequentieller Kopplung von <i>A. oryzae</i> (3 h, ca. 54 % Hydrolyse) und <i>C. laurentii</i> .....	102
<b>Abbildung 4-40:</b> HPLC-Chromatogramme der GOS-Fractionen (DP = Polymerisationsgrad) auf der Hi-Plex Na-Säule für verschiedene Kombinationen von <i>A. oryzae</i> und <i>C. laurentii</i> .....	103
<b>Abbildung 4-41:</b> GOS-Zusammensetzung (DP = Polymerisationsgrad) in % des Gesamtzuckers in Abhängigkeit vom Hydrolysegrad bei paralleler Synthese mit <i>A. oryzae</i> und <i>C. laurentii</i> (offene Symbole) und alleiniger Synthese mit <i>C. laurentii</i> (geschlossene Symbole) .....	104
<b>Abbildung 4-42:</b> GOS-Zusammensetzung (DP = Polymerisationsgrad) in % des Gesamtzuckers in Abhängigkeit von verschiedenen Enzymkombinationen .....	104
<b>Abbildung 4-43:</b> Zusammensetzung der Reaktionslösung zum Zeitpunkt der maximalen GOS-Ausbeute in Abhängigkeit von verschiedenen Enzymquellen und -kombinationen. ....	105
<b>Abbildung 4-44:</b> Einfluss der Substitution von Fleischpepton im Standard-MRS-Medium (Fleisch-MRS) mit Sojapepton bzw. Caseinpepton auf Wachstum (A), $\beta$ -Galactosidase-Synthese (B), Proteinbildung (C) und spezifische Enzymaktivität (D) mit <i>L. bulgaricus</i> LB4 .....	106
<b>Abbildung 4-45:</b> Einfluss verschiedener Caseinpeptone (CP) und Hefeextrakte (HE) auf Medien-pH (A), Wachstum (B) und $\beta$ -Galactosidase-Synthese (C) mit <i>L. bulgaricus</i> LB4 .....	108
<b>Abbildung 4-46:</b> Größenanalyse der Caseinpeptone (CP) mittels FPLC .....	110
<b>Abbildung 4-47:</b> Wachstum ( $OD_{600}$ , A) und $\beta$ -Galactosidase-Synthese pro Liter Kulturmedium (B) von <i>L. bulgaricus</i> LB4 im Fermentormaßstab .....	112
<b>Abbildung A.7-1:</b> Temperaturwirkungsbereich verschiedener $\beta$ -Galactosidasen .....	141
<b>Abbildung A.7-2:</b> pH-Wirkungsbereich verschiedener $\beta$ -Galactosidasen .....	141
<b>Abbildung A.7-3:</b> Scopus-Recherche zum Thema GOS-Synthese allgemein (blau) sowie in Milch und Molke (rot) .....	160
<b>Abbildung A.7-4:</b> GOS-Ausbeute mit $\beta$ -Galactosidase aus <i>A. oryzae</i> (A), <i>K. lactis</i> (B) und <i>B. circulans</i> (C) in Abhängigkeit vom Lactoseumsatz zum Zeitpunkt der maximalen Ausbeute in verschiedenen Substraten der Molkereiindustrie und Puffern .....	161
<b>Abbildung A.7-5:</b> Korrelation zwischen Anfangslactosekonzentration (ILC) und GOS-Ausbeute (Y) für $\beta$ -Galactosidase aus <i>Aspergillus oryzae</i> in Puffer und Molkereisubstraten, vgl. auch Tabelle A.7-3 .....	162
<b>Abbildung A.7-6:</b> Korrelation zwischen Anfangslactosekonzentration und GOS-Ausbeute für $\beta$ -Galactosidase aus <i>Kluyveromyces lactis</i> (A) und <i>Bacillus circulans</i> (B) in Puffer (helle Symbole) und Molkereisubstraten (dunkle Symbole) .....	162
<b>Abbildung A.7-7:</b> Wachstum ( $OD_{600}$ bzw. BTM) und $\beta$ -Galactosidase-Synthese (Assay bei 65 mmol/L oNPG in 50 mmol/L Na-Phosphat-Puffer pH 5,0, 50°C) von <i>C. laurentii</i> DSM 27153 in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer. ....	167
<b>Abbildung A.7-8:</b> HPLC-Chromatogramme des GOS-Sirups VIVINAL GOS von Friesland Campina auf der Zorbax Carbohydrate-Säule (A) und der Microsorb-MV 100 $NH_2$ -Säule (B) .....	169
<b>Abbildung A.7-9:</b> Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Temperatur für $\beta$ -Galactosidase-Präparate aus <i>K. lactis</i> .....	170
<b>Abbildung A.7-10:</b> Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Temperatur für $\beta$ -Galactosidase-Präparate aus <i>A. oryzae</i> .....	170
<b>Abbildung A.7-11:</b> Inaktivierungskinetik von $\beta$ -Galactosidase aus <i>K. lactis</i> (optilactase LX2) in 50 mmol/L Na-Phosphat-Puffer pH 6,0 (A), pH 6,5 (B), pH 7,0 (C) und pH 7,5 (D) sowie in Süßmolke (E, 39 g/L Lactose) und konz. Süßmolke (F, 200 g/L Lactose) .....	173

<b>Abbildung A.7-12:</b> Inaktivierungskinetik von $\beta$ -Galactosidase aus <i>L. acidophilus</i> LA3 (Rohextrakt) in 50 mmol/L Na-Phosphat-Puffer pH 6,0 (A), pH 6,5 (B), pH 7,0 (C) und pH 7,5 (D) sowie in Süßmolke (E, 39 g/L Lactose) und konz. Süßmolke (F, 200 g/L Lactose) .....	174
<b>Abbildung A.7-13:</b> Inaktivierungskinetik von $\beta$ -Galactosidase aus <i>L. bulgaricus</i> LB4 (Rohextrakt) in 50 mmol/L Na-Phosphat-Puffer pH 6,0 (A), pH 6,5 (B), pH 7,0 (C) und pH 7,5 (D) sowie in Süßmolke (E, 39 g/L Lactose) und konz. Süßmolke (F, 200 g/L Lactose) .....	175
<b>Abbildung A.7-14:</b> Inaktivierungskinetik von $\beta$ -Galactosidase aus <i>L. bulgaricus</i> LB8 (Rohextrakt) in 50 mmol/L Na-Phosphat-Puffer pH 6,0 (A), pH 6,5 (B), pH 7,0 (C) und pH 7,5 (D) sowie in Süßmolke (E, 39 g/L Lactose) und konz. Süßmolke (F, 200 g/L Lactose) .....	176
<b>Abbildung A.7-15:</b> Inaktivierungskinetik von $\beta$ -Galactosidase aus <i>L. bulgaricus</i> SP5 (Rohextrakt) in 50 mmol/L Na-Phosphat-Puffer pH 6,0 (A), pH 6,5 (B), pH 7,0 (C) und pH 7,5 (D) sowie in Süßmolke (E, 39 g/L Lactose) und konz. Süßmolke (F, 200 g/L Lactose) .....	177
<b>Abbildung A.7-16:</b> Inaktivierungskinetik von $\beta$ -Galactosidase aus <i>L. reuteri</i> LR92 (Rohextrakt) in 50 mmol/L Na-Phosphat-Puffer pH 6,0 (A), pH 6,5 (B), pH 7,0 (C) und pH 7,5 (D) sowie in Süßmolke (E, 39 g/L Lactose) und konz. Süßmolke (F, 200 g/L Lactose) .....	178
<b>Abbildung A.7-17:</b> Inaktivierungskinetik von $\beta$ -Galactosidase aus <i>A. oryzae</i> (Maxilact A4) in 50 mmol/L McIlvaine-Puffer pH 4,5 (P), Caseinmolke (CM) und Sauermolkenpermeat-Konzentrat (SMPK). .....	179
<b>Abbildung A.7-18:</b> Inaktivierungskinetik von $\beta$ -Galactosidase aus <i>C. laurentii</i> (ganze Zellen) in 50 mmol/L McIlvaine-Puffer pH 4,5 (A), rekonstituierter Sauermolke (B, mit Pulver von Euroduna Food Ingredients GmbH), Griechischer Joghurt-Molke (C) und Caseinmolke (D). .....	179
<b>Abbildung A.7-19:</b> Arrhenius-Diagramme der $\beta$ -Galactosidase-Inaktivierung in 50 mmol/L Na-Phosphat-Puffer (pH 6,0–7,0), Süßmolke (39 g/L Lactose) und konzentrierter Süßmolke (200 g/L Lactose) .....	180
<b>Abbildung A.7-20:</b> Arrhenius-Diagramme der $\beta$ -Galactosidase-Inaktivierung in 50 mmol/L McIlvaine-Puffer pH 4,5 und verschiedenen Arten von Sauermolke .....	181
<b>Abbildung A.7-21:</b> Linien gleichen Effekts zur 99 %-igen $\beta$ -Galactosidase-Inaktivierung in Süßmolke (für <i>K. lactis</i> und <i>Lactobacillus</i> sp.) und Caseinmolke (für <i>A. oryzae</i> und <i>C. laurentii</i> ) .....	181
<b>Abbildung A.7-22:</b> Inaktivierungskinetik von Katalase aus <i>Micrococcus lysodeikticus</i> in PEM-Puffer pH 6,5 (rot) und Na-Acetat-Puffer pH 4,5 (blau). .....	182
<b>Abbildung A.7-23:</b> Lactoseabbau während der GOS-Synthese mit <i>K. lactis</i> (optilactase LX2) in PEM-Puffer (A), Süßmolke (B) und Sauermolke (C) .....	184
<b>Abbildung A.7-24:</b> GOS-Ausbeute in konzentrierter Süßmolke (200 g/L ILC) in Abhängigkeit vom Lactoseumsatz mit verschiedenen $\beta$ -Galactosidase-Präparaten aus <i>K. lactis</i> .....	185
<b>Abbildung A.7-25:</b> Lactoseabbau während der GOS-Synthese mit <i>A. oryzae</i> in deion. Wasser (W, optilactase A50) bzw. McIlvaine-Puffer (P, Maxilact A4) (A), Süßmolke (B) und Sauermolke (C) .....	186
<b>Abbildung A.7-26:</b> Lactoseabbau während der GOS-Synthese mit <i>A. oryzae</i> (Maxilact A4) in verschiedenen Sauermolke-Proben .....	187
<b>Abbildung A.7-27:</b> Lactoseabbau während der GOS-Synthese mit <i>L. bulgaricus</i> LB4 in Puffer (A) und Süßmolke (B) .....	188
<b>Abbildung A.7-28:</b> Menge der von <i>L. bulgaricus</i> LB4 gebildeten GOS-Fractionen DP2, DP3 und DP4 (A, % der Gesamtzucker) und Anteil der Fractionen an den Gesamt-GOS (B) in Abhängigkeit von der Synthesetemperatur .....	189
<b>Abbildung A.7-29:</b> Lactoseabbau während der GOS-Synthese mit <i>C. laurentii</i> (ganze Zellen) in verschiedenen Sauermolke-Proben .....	190
<b>Abbildung A.7-30:</b> Konzentration freier Calcium-Ionen während der GOS-Synthese mit $\beta$ -Galactosidase aus <i>K. lactis</i> , Glucose-Oxidase und Katalase .....	192
<b>Abbildung A.7-31:</b> Glc/Gal-Verhältnis während der GOS-Synthese mit <i>K. lactis</i> (optilactase LX2) und <i>A. oryzae</i> (Maxilact A4) sowie der sequentiellen Kombination von <i>K. lactis</i> und <i>A. oryzae</i> (Inaktivierung des jeweils ersten Enzyms) .....	193

<b>Abbildung A.7-32:</b> Glc/Gal-Verhältnis während der GOS-Synthese mit <i>A. oryzae</i> (Maxilact A4) und <i>C. laurentii</i> sowie der sequentiellen Kombination von <i>A. oryzae</i> und <i>C. laurentii</i> (Inaktivierung des jeweils ersten Enzyms) .....	193
<b>Abbildung A.7-33:</b> Einfluss verschiedener Caseinpeptone (CP) und Hefeextrakte (HE) auf $\beta$ -Galactosidase-Synthese (A), Proteinbildung (B) und spezifische Enzymaktivität (C) mit <i>L. bulgaricus</i> LB4.....	194
<b>Abbildung A.7-34:</b> Korrelation von Biotrockenmasse (BTM) und pH-Wert nach der Kultivierung (15 h) mit <i>L. bulgaricus</i> LB4.....	195
<b>Abbildung A.7-35:</b> Größenanalyse der komplexen N-Quellen Fleischextrakt (Carl Roth), Fleischpepton (Sigma Aldrich), Sojapepton und Caseinpepton (beide von Otto Nordwald) mittels FPLC .....	195
<b>Abbildung A.7-36:</b> Verlauf von Medien-pH (A), Sauerstoffsättigung (B, 100 % entspricht einer Sättigung mit Luft) und Biotrockenmasse (C) bei der Kultivierung von <i>L. bulgaricus</i> LB4 unter verschiedenen Bedingungen in Caseinpepton-MRS-Medium bei 37°C.....	196



## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 2-1:</b> Makronährstoffe in Molke nach Pesta et al. [30] .....	4
<b>Tabelle 2-2:</b> Mineralstoff- und Milchsäuregehalte in Süß- und Sauermolke nach Bylund [24] .....	5
<b>Tabelle 2-3:</b> Molkenaufkommen weltweit im Vergleich zu den USA, Europa und Deutschland .....	5
<b>Tabelle 2-4:</b> Einfluss von Milch und Molke auf die relative Enzymaktivität im Vergleich zum Referenzmedium ...	9
<b>Tabelle 2-5:</b> Inhibitorwirkung von Glucose und Galactose auf $\beta$ -Galactosidasen (freies Enzym) aus verschiedenen Quellen .....	10
<b>Tabelle 2-6:</b> Übersicht kommerziell erhältlicher $\beta$ -Galactosidase-Präparate .....	11
<b>Tabelle 2-7:</b> Transgalactosylierungsaktivität einiger $\beta$ -Galactosidasen gemessen anhand des GOS/Gal-Faktors. ....	14
<b>Tabelle 2-8:</b> Einfluss der Enzymform auf die GOS-Ausbeute .....	15
<b>Tabelle 2-9:</b> Einfluss des pH-Wertes auf die relative GOS-Ausbeute sortiert nach Enzymquelle .....	18
<b>Tabelle 2-10:</b> Einfluss der Reaktionstemperatur auf die relative GOS-Ausbeute sortiert nach Enzymquelle .....	19
<b>Tabelle 2-11:</b> Einfluss der initialen Zugabe von Glucose und Galactose auf die GOS-Ausbeute inklusive ( $DP \geq 2$ ) bzw. exklusive ( $DP \geq 3$ ) Disaccharid-GOS in Abhängigkeit von der verwendeten Enzymquelle. ....	22
<b>Tabelle 2-12:</b> Einfluss des Reaktionsmediums auf die GOS-Zusammensetzung .....	25
<b>Tabelle 2-13:</b> Zusammensetzung kommerziell erhältlicher GOS-Produkte sortiert nach Enzymquelle .....	29
<b>Tabelle 2-14:</b> Temperaturstabilität verschiedener GOS-Produkte .....	30
<b>Tabelle 2-15:</b> Literaturdaten zur Transsialylierung von GOS .....	35
<b>Tabelle 2-16:</b> Synthese von Heterooligosacchariden (HeOS) mit $\beta$ -Galactosidasen verschiedener Enzymquellen .....	36
<b>Tabelle 2-17:</b> Identifizierte Strukturen bei der Synthese von GlcNAc-haltigen HeOS mittels $\beta$ -Galactidasen verschiedener Enzymquellen .....	37
<b>Tabelle 3-1:</b> Parameter zur Bestimmung von Temperatur- und pH-Optimum der $\beta$ -Galactosidasen .....	45
<b>Tabelle 3-2:</b> Parameter zur Bestimmung der $\beta$ -Galactosidase-Aktivität bei Anwesenheit verschiedener Effektoren. ....	46
<b>Tabelle 4-1:</b> Zusammensetzung der verwendeten Süßmolken .....	51
<b>Tabelle 4-2:</b> Zusammensetzung der verwendeten Sauermolken .....	52
<b>Tabelle 4-3:</b> Überblick über den Einfluss von Glucose, Galactose und verschiedener mono- und divalenter Kationen (als Chlorid-Salz) im Bereich 1–100 mmol/L auf die oNPG-Aktivität verschiedener $\beta$ -Galactosidasen .....	55
<b>Tabelle 4-4:</b> Halbwertszeit $t_{1/2}$ bei 50°C in Abhängigkeit von der Enzymquelle und dem umgebenden Medium ..	59
<b>Tabelle 4-5:</b> Z-Wert in Abhängigkeit von der Enzymquelle und dem umgebenden Medium bei pH 6,5 .....	60
<b>Tabelle 4-6:</b> Halbwertszeit $t_{1/2}$ bei 55°C in Abhängigkeit von der Enzymquelle und dem umgebenden Medium ..	61
<b>Tabelle 4-7:</b> Z-Wert in Abhängigkeit von der Enzymquelle und dem umgebenden Medium bei pH 4,5 .....	61
<b>Tabelle 4-8:</b> Zusammensetzung der Reaktionslösung in % der Gesamtzucker und Transgalactosylierungsaktivität (GOS/Gal-, Glc/Gal- bzw. GOS/reacLac-Faktor) von $\beta$ -Galactosidase aus <i>L. bulgaricus</i> LB4 zum Zeitpunkt maximaler GOS-Ausbeute in Abhängigkeit von der Reaktionstemperatur in Puffer .....	75
<b>Tabelle 4-9:</b> Zusammensetzung der Reaktionslösung in % der Gesamtzucker und Transgalactosylierungsaktivität (GOS/Gal-, Glc/Gal- bzw. GOS/reacLac-Faktor) von $\beta$ -Galactosidase aus <i>L. bulgaricus</i> LB4 zum Zeitpunkt maximaler GOS-Ausbeute in Abhängigkeit von der Reaktionstemperatur in Süßmolke .....	78
<b>Tabelle 4-10:</b> GOS-Ausbeute und -Zusammensetzung (Mittelwerte aus $n = 2$ , $n = 1$ für <i>L. bulgaricus</i> bei 50°C) in Puffer in Abhängigkeit von der Enzymquelle .....	83
<b>Tabelle 4-11:</b> GOS-Ausbeute und -Zusammensetzung (Mittelwerte aus $n = 2$ , $n = 1$ für <i>L. bulgaricus</i> bei 50°C) in rekonstituierter Süßmolke in Abhängigkeit von der Enzymquelle .....	85

<b>Tabelle 4-12:</b> GOS-Ausbeute und -Zusammensetzung (Mittelwerte aus n = 2) in Sauermolke in Abhängigkeit von der Enzymquelle .....	86
<b>Tabelle 4-13:</b> Zusammensetzung der Reaktionslösung zum Zeitpunkt der maximalen GOS-Ausbeute unter Verwendung der $\beta$ -Galactosidasen aus <i>K. lactis</i> und <i>A. oryzae</i> , jeweils mit und ohne Glucose-Oxidase/Katalase (GOX/KAT).....	94
<b>Tabelle 4-14:</b> Charakterisierung der komplexen N-Quellen hinsichtlich AN/TN-Verhältnis.....	109
<b>Tabelle 4-15:</b> Vergleich der Enzymausbeute und der pH-Reduktion als Wachstumsindikator in Standard- und Caseinpepton-MRS (CPO, ohne Hefeextrakt) sowie Magermilch .....	111
<b>Tabelle 4-16:</b> Wachstumsparameter und Enzymausbeuten von <i>L. bulgaricus</i> LB4 unter verschiedenen Fermentationsbedingungen .....	113
<b>Tabelle A.7-1:</b> Überblick über die Molekülmasse einiger $\beta$ -Galactosidasen .....	140
<b>Tabelle A.7-2:</b> Einfluss mono- und divalenter Kationen auf die $\beta$ -Galactosidase-Aktivität .....	142
<b>Tabelle A.7-3:</b> Überblick über GOS-Synthesen in den Komplexmedien Molke, Milch und Permeat sowie Puffer zum Vergleich .....	145
<b>Tabelle A.7-4:</b> Übersicht über GOS-Ausbeute (% des Gesamtzuckers) und -Zusammensetzung (% der Gesamt-GOS, auf ganze Zahlen gerundet, daher Abw. von 100 % mgl.) mit verschiedenen <i>Lactobacillus</i> -Stämmen .....	155
<b>Tabelle A.7-5:</b> Zusammensetzung kommerziell erhältlicher GOS-Produkte sortiert nach Enzymquelle .....	163
<b>Tabelle A.7-6:</b> Übersicht über die im Rahmen der Dissertation verwendeten Geräte.....	165
<b>Tabelle A.7-7:</b> Zusammensetzung des Standard-MRS-Mediums.....	166
<b>Tabelle A.7-8:</b> Tatsächliche Anfangslactosekonzentrationen der GOS-Synthese-Versuche.....	167
<b>Tabelle A.7-9:</b> Katalaseaktivität in verschiedenen Puffer-Systemen zur Berechnung des gewünschten E/S-Verhältnisses bei der GOS-Synthese. ....	168
<b>Tabelle A.7-10:</b> Effekt mono- und divalenter Kationen auf die relative $\beta$ -Galactosidase-Aktivität.....	171
<b>Tabelle A.7-11:</b> Einfluss der Hydrolyseprodukte Glucose und Galactose auf die relative $\beta$ -Galactosidase-Aktivität .....	172
<b>Tabelle A.7-12:</b> Halbwertszeiten ( $t_{1/2}$ ) von Katalase in Abhängigkeit von pH und Temperatur.....	182
<b>Tabelle A.7-13:</b> Zusammensetzung der GOS-Fraktion in % der Gesamt-GOS bei der Synthese mit <i>C. laurentii</i> in 50 mmol/L McIlvaine-Puffer zum Zeitpunkt der maximalen Ausbeute .....	190
<b>Tabelle A. 7-14:</b> Maximale GOS-Ausbeute in Puffer, Süßmolke, verschiedenen Arten von Sauermolke sowie Süß- und Sauermolkenkonzentraten in Abhängigkeit von der verwendeten Enzymquelle.....	191

# 1 Einleitung und Zielstellung

Die Synthese von Galactooligosacchariden (GOS) wurde erstmals 1951 von Wallenfels [1] mit einer  $\beta$ -Galactosidase aus *Aspergillus oryzae* beschrieben und kurze Zeit später (1952) von Aronson [2] mit  $\beta$ -Galactosidasen aus *Kluyveromyces fragilis* und *Escherichia coli* bestätigt. Sie galten noch bis Mitte der 1980er Jahre als unerwünschtes Nebenprodukt bei der Hydrolyse von Lactose [3, 4] aufgrund des Verdachts, Flatulenz auszulösen [5]. Die Untersuchung verschiedener Einflussparameter auf die GOS-Synthese hatte daher zunächst das Ziel, die Konzentration an Oligosacchariden möglichst gering zu halten [3, 4]. Allerdings wurde bereits 1983 für GOS aus *A. oryzae* gezeigt, dass diese sowohl in vitro als auch in vivo das Wachstum von Bifidobakterien stimulieren und damit als „Bifidus-Faktor“ bei Säuglingen, die nicht gestillt werden können, fungieren könnten [6]. Wenige Jahre später konnte dies auch für das Galactooligosaccharid 4'-Galactosyllactose gezeigt werden [7]. Folglich gab es bereits kurze Zeit später entgegengesetzte Bestrebungen, nämlich die Transgalactosylierungsaktivität von  $\beta$ -Galactosidasen zu fördern und somit die Synthese von GOS zu optimieren [8].

Mittlerweile gibt es eine Vielzahl an Studien, die den positiven Effekt von GOS auf das Wachstum von intestinalen Bifidobakterien und Laktobazillen belegen. Sie erfüllen somit die 1995 von Gibson & Roberfroid [9] aufgestellte Definition für Prebiotika. Um diese prebiotische Wirkung auch ausloben zu können, wurden bei der EFSA gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1924/2006 [10] bisher 13 Anträge auf Erteilung eines sogenannten *Health Claims* (gesundheitsbezogene Angaben) für GOS bzw. GOS-haltige Zusammensetzungen eingereicht [11], wovon allerdings bis dato keiner autorisiert wurde (Stand Juli 2019). Im Sinne der Verordnung (EU) Nr. 1169/2011 [12] ist jedoch nach Meinung des NDA-Gremiums der EFSA speziell auch für GOS die Auslobung als Ballaststoff (ab 3 Monomer-Einheiten) möglich [13]. So bewirbt beispielsweise HiPP GmbH & Co. Vertrieb KG ihre Anfangsnahrung auf der Verpackung mit dem Zusatz „wertvolle Ballaststoffe GOS“ [14].

Das weltweite Marktvolumen von Galactooligosacchariden wird für 2020 auf ca. 176.000 Tonnen mit einer jährlichen Wachstumsrate von 9,3 % geschätzt [15]. Der Verkaufspreis liegt bei ca. 5,8 USD/kg [16], was in Anbetracht des niedrigen Preises für das Ausgangsmaterial Lactose (ca. 0,8 USD/kg [17]) eine beträchtliche Gewinnmarge darstellt und das bis dato ungebrochene Forschungsinteresse erklärt.

Während kommerzielle GOS-Produkte bisher aus reinen Lactoselösungen gewonnen werden, gibt es in der wissenschaftlichen Forschung seit etwa 10 Jahren zunehmende Bestrebungen, Nebenströme der Molkereiindustrie wie Molke und Molkenpermeat, aber auch Milch als Ausgangsmaterial für die GOS-Synthese zu nutzen. Somit lassen sich weitere Prozessschritte wie die Filtration [18] oder die Ionenaustauschchromatographie [19] zur Abtrennung von Proteinen bzw. Salzen umgehen und die so erzeugten GOS-angereicherten Milchprodukte direkt in Lebensmittel einarbeiten [20]. Vor allem der Rohstoff Molke bleibt bisher zu einem großen Teil ungenutzt, wobei insbesondere die sogenannte Sauermolke aufgrund der hohen Azidität schwer zu verwerten ist.

Die vorliegende Arbeit hatte somit primär zum Ziel, die Synthese von Galactooligosacchariden in Süß- sowie auch Sauermolke zu evaluieren. Da die in der Fachliteratur verhältnismäßig oft zur GOS-Synthese eingesetzten kommerziellen  $\beta$ -Galactosidasen aus *A. oryzae* und *Kluyveromyces lactis* vorrangig aufgrund ihrer ausgeprägten hydrolytischen Aktivität vermarktet werden, galt es,  $\beta$ -Galactosidasen aus anderen Enzymquellen auf ihre Fähigkeit zur Transgalactosylierung zu untersuchen.

Basierend auf der Literaturstudie wurden verschiedene Untersuchungsziele definiert und folgende Thesen aufgestellt:

**1. Die Affinität zur GOS-Synthese in Süß- bzw. Sauermolke wird in Abhängigkeit von der gewählten Enzymquelle unterschiedlich stark beeinflusst.**

Um diese These zu belegen, wurde der Arbeitsplan in folgende Unterpunkte eingeteilt:

**a) Synthese mit kommerziell verfügbaren  $\beta$ -Galactosidasen**

Ausgewählt wurden Enzyme aus *Aspergillus oryzae* und *Kluyveromyces lactis*. Deren GOS-Syntheseleistung sollte in Süß- und Sauermolke verschiedener Konzentrationen untersucht und im Vergleich zu gepufferten Lactoselösungen bewertet werden. Diese Ergebnisse sollten als Vergleichsgrundlage für die alternativen, d. h. kommerziell noch nicht erhältlichen  $\beta$ -Galactosidasen dienen.

**b) Synthese mit  $\beta$ -Galactosidasen alternativer Enzymquellen**

Ein Kriterium für die Auswahl der Mikroorganismen war die Wirksamkeit im entsprechenden pH-Milieu. Für den Einsatz in Süßmolke (pH 6,5) wurden verschiedene  $\beta$ -Galactosidasen aus *Lactobacillus* sp. charakterisiert und schließlich der Stamm *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (kurz: *L. bulgaricus*) LB4 für die GOS-Synthese gewählt. Die Auswahl erfolgte zum einen aufgrund des GRAS-Status und des vielfältigen Einsatzes in Starterkulturen bei der Joghurt- und Käseherstellung, zum anderen aufgrund der literaturgestützten These [21], dass intestinale Bakterien (zu denen auch Laktobazillen gehören) besonders gut auf GOS wachsen, die mit Enzymen der eigenen Spezies synthetisiert wurden. Insbesondere wurde der Einfluss der Temperatur auf die Syntheseleistung in Puffer und Süßmolke untersucht.

Für die Anwendung in Sauermolke (pH 4,5) wurde eine  $\beta$ -Galactosidase aus *Cryptococcus laurentii* gewählt, da dies eine der wenigen Lactasen ist, welche ihr Wirkoptimum im sauren pH-Bereich aufweist. Ein Enzym dieser Spezies wird zudem für die Herstellung eines kommerziell erhältlichen GOS-Produktes verwendet, wäre also folglich industriell nutzbar. Das Enzym selbst ist jedoch käuflich nicht zu erwerben, sodass ein entsprechender Stamm angezogen und in Form ganzer Zellen verwendet wurde. In der wissenschaftlichen Fachliteratur gibt es bislang keine Untersuchungen zum Einsatz einer *C. laurentii*-Lactase in Molke. Die Untersuchungen fanden in verschiedenen Arten von Sauermolke sowie in Puffer als Vergleichssystem statt.

Zur Auswahl geeigneter Reaktionsparameter während der GOS-Synthese wurden die Enzyme zunächst hinsichtlich Temperatur- und pH-Optimum sowie der Stabilität charakterisiert. Auch sollten mögliche Inhibitoren im Komplexmedium Molke identifiziert werden.

**c) Untersuchungen zur  $\beta$ -Galactosidase-Produktion des ausgewählten Mikroorganismus (*L. bulgaricus* LB4)**

Für eine kommerzielle Nutzung der Ergebnisse ist die  $\beta$ -Galactosidase-Produktion den industriellen Bedürfnissen anzupassen. Um eine breite Anwendung zu ermöglichen, sollte die Enzymherstellung unter koscher- bzw. halal-gerechten Gesichtspunkten durchgeführt werden. Hierfür ist es notwendig, die Nährmedienzusammensetzung des standardmäßig für Laktobazillen verwendeten MRS-Mediums entsprechend anzupassen. Somit galt es, die

Fleisch enthaltenden Bestandteile durch alternative Rohstoffe zu ersetzen. Hierfür wurden entsprechend zertifizierte Caseinpeptone und Hefeextrakte verschiedener Hersteller untersucht. Auch sollte eine Übertragung vom Labor/Schüttelkolben-Maßstab auf einen regelbaren Biofermentor erfolgen, um die Randbedingungen der Kultivierung festlegen zu können. Gegenstand hierbei waren der Einfluss von der pH-Wert-Führung sowie der An- bzw. Abwesenheit von Sauerstoff auf Wachstum und Enzymbildung.

**2. Die Entfernung von Glucose während der GOS-Synthese führt zu einer Steigerung der GOS-Ausbeute.**

Um den Einfluss der Glucose-Entfernung auf die GOS-Ausbeute zu untersuchen, wurde die Methode der Glucose-Oxidation durch das Enzymsystem Glucose-Oxidase/Katalase gewählt. Zum Zeitpunkt des Beginns der Arbeiten existierten hierzu lediglich zwei Publikationen mit unterschiedlichem Ergebnis. Der Einfluss auf die in der Fachliteratur ansonsten häufig zur GOS-Synthese verwendeten  $\beta$ -Galactosidasen aus *A. oryzae* und *K. lactis* war bis dato unbekannt. Neben dem Einfluss auf die Gesamtausbeute, sollte auch die Entwicklung der einzelnen GOS-Strukturen (hinsichtlich Kettenlänge) erfasst werden. Ebenfalls musste der Versuch unter kontrollierten Bedingungen (konstante Sauerstoffzufuhr, keine Verdunstungserscheinungen, pH-Wert-Anpassung) realisiert werden. Hierfür wurde die GOS-Synthese in einem Bioreaktor-System durchgeführt.

**3. Durch die Verwendung von mehreren  $\beta$ -Galactosidasen kann die GOS-Ausbeute im Vergleich zum Einsatz von nur einem Enzym gesteigert werden.**

Bisherige Forschungsergebnisse zur Kombination mehrerer  $\beta$ -Galactosidasen sind spärlich und beschränken sich vor allem auf Dissertations- bzw. Patentschriften. Aufgrund der bekannten Präferenz von  $\beta$ -Galactosidasen aus unterschiedlichen Enzymquellen für die Bildung spezifischer glykosidischer Bindungen wurde die These aufgestellt, dass der Einsatz mehrerer Enzyme zu einer Steigerung der GOS-Ausbeute sowie zur Erhöhung der Strukturdiversität innerhalb der synthetisierten GOS-Verbindungen führt. Aufgrund der Tatsache, dass GOS nur ein Zwischenprodukt darstellen und damit auch als Substrat fungieren, wurde vermutet, dass die Applikationsreihenfolge der Enzyme aufgrund unterschiedlicher Substrataffinitäten ebenfalls einen signifikanten Einfluss auf das Ergebnis hat. Untersucht wurden daher zwei verschiedene Enzymkombinationen (*A. oryzae* und *K. lactis*, *A. oryzae* und *C. laurentii*) sowie die parallele und sequentielle (inkl. Enzymreihenfolge) Prozessführung hinsichtlich Gesamtausbeute und GOS-Zusammensetzung.

## 2 Stand des Wissens

### 2.1 Molke: Aufkommen, Inhaltsstoffe und Verwertungsmöglichkeiten

Als Molke wird die Flüssigkeit bezeichnet, welche nach der Fällung des Caseins aus Milch übrig bleibt [22]. Hierbei wird zwischen Süßmolke und Sauermolke unterschieden. Bei erstgenannter wird mit Lab oder Labersatzenzymen gefällt, welche  $\kappa$ -Casein zwischen der 105. (Phenylalanin) und 106. (Methionin) Aminosäure spalten [23]. Der pH-Wert verbleibt somit im neutralen Bereich von ca. 6,0–6,5. Aus ca. 10 L Milch entstehen so 1 kg Hartkäse und ca. 9 L Molke [24, 25]. Bei der Herstellung von Frischkäse (inkl. Quark) wird Casein aufgrund der pH-Wert-Absenkung während der Fermentation mit Milchsäurebakterien ausgefällt. Demnach liegt der pH-Wert der daraus resultierenden Sauermolke am isoelektrischen Punkt des Caseins bei ca. 4,6. Aufgrund des höheren Wassergehaltes von Frischkäseprodukten ist der Molkenanfall etwas niedriger, beispielsweise beträgt das Verhältnis Produkt:Molke für Cottage Cheese etwa 1:6 [26], für Frischkäse und Quark ca. 1:1,55 [27]. Eine andere Art von Sauermolke entsteht bei der direkten Fällung mit Säuren bei der Casein-Herstellung (sogenannte Caseinmolke) mit einem Rohstoffeinsatz von ca. 30 kg pro kg Produkt [27] und bei der Produktion von Abtropfjoghurt (sogenannter Griechischer Joghurt). Bei letztgenanntem entstehen aus 4 L Milch etwa 1 kg Joghurt und 3 L Molke [28].

Die Trockenmasse-Fraktion von Molke macht ca. 6 % der Gesamtmasse aus und enthält vorrangig Lactose (70–72 % der TM), Molkenproteine (8–10 % der TM) und Mineralien (12–15 % der TM) [22]. Insgesamt enthält Molke ca. 50 % der Nährstoffe der Milch [24, 29]. Eine Übersicht findet sich in Tabelle 2-1 und Tabelle 2-2.

**Tabelle 2-1:** Makronährstoffe in Molke nach Pesta et al. [30].

	Süßmolke	Sauermolke	Caseinmolke
<b>Trockenmasse [g/L]</b>	62,0	57,0	61,0
<b>Lactose [g/L]</b>	48,0	46,0	47,0
<b>Protein [g/L]</b>	7,5	3,0	5,0
<b>Fett [g/L]</b>	0,5	< 0,1	< 0,1
<b>Asche [g/L]</b>	6,0	8,0	9,0
<b>pH [-]</b>	6,10	4,60	4,40

Süß- und Sauermolke unterscheiden sich neben dem pH-Wert vor allem im Mineralstoffgehalt und der Zusammensetzung der Molkenproteine. Süßmolke enthält aufgrund der Spaltung des  $\kappa$ -Caseins das sogenannte Caseinmakropeptid (CMP, auch: Glycomacropeptid (GMP)), welches ca. 20 % der Molkenproteine ausmacht und in Sauermolke nicht zu finden ist (abgesehen von kombinierter Lab-Säure-Fällung wie beispielsweise bei Cottage Cheese). Der erhöhte Aschegehalt in Sauermolke ist vor allem auf Calcium und Phosphor (Tabelle 2-2) zurückzuführen aufgrund des Herauslösens von Calciumphosphat aus den Caseinmicellen während der Säuerung [31]. Sauermolke enthält etwas weniger Lactose aufgrund der Verstoffwechselung selbiger durch die Starterkulturen und dementsprechend größere Mengen an Milchsäure. Analog enthält auch Sauermolke aus der Griechischen

Joghurt-Produktion geringere Mengen an Lactose (ca. 43 g/L) sowie deutlich weniger Protein (ca. 3 g/L) [32]. Der pH-Wert hängt von der Prozessführung der Joghurtherstellung ab und kann Werte von bis zu 3,5 erreichen [33].

**Tabelle 2-2:** Mineralstoff- und Milchsäuregehalte in Süß- und Sauermolke nach Bylund [24].

Mineralien	Süßmolke	Sauermolke
Calcium [g/L]	0,43	1,20
Phosphor [g/L]	0,40	0,65
Natrium [g/L]	0,50	0,50
Kalium [g/L]	1,60	1,60
Chlorid [g/L]	1,10	1,10
Milchsäure [g/L]	0,50	4,00

Bei einer weltweiten Käseproduktion von etwa 22,5 Mio. Tonnen [34], fielen im Jahr 2016 ca. 202,2 Mio. Tonnen Molke an. Dies entspricht einer Trockenmasse von mehr als 12 Mio. Tonnen (Tabelle 2-3), welche weiteren Verwertungsmöglichkeiten zugeführt werden kann. Die Tendenz ist bei einer Wachstumsrate von ca. 2 % steigend [35]. Hinzu kommt Sauermolke aus der Casein-Herstellung, deren Anteil weltweit mit 5 % (2008) [36], für Europa mit 15 % (2016) [37] und für Deutschland mit ca. 2,9 %<sup>1</sup> (2015) [27] angegeben wird. In den USA beträgt der Anteil von Sauermolke (nur aus der Cottage Cheese-Produktion) etwa 4,1 % des gesamten Molkenaufkommens (entspricht ca. 46,4 Mio. Tonnen Molke) [26]. Aufgrund des steigenden Interesses an sogenanntem Griechischem Joghurt (Abtropfjoghurt) mit einem Marktanteil von über 50 % [38], ist jedoch speziell in den USA mit einem tendenziell ansteigenden Sauermolkenaufkommen zu rechnen [33, 39].

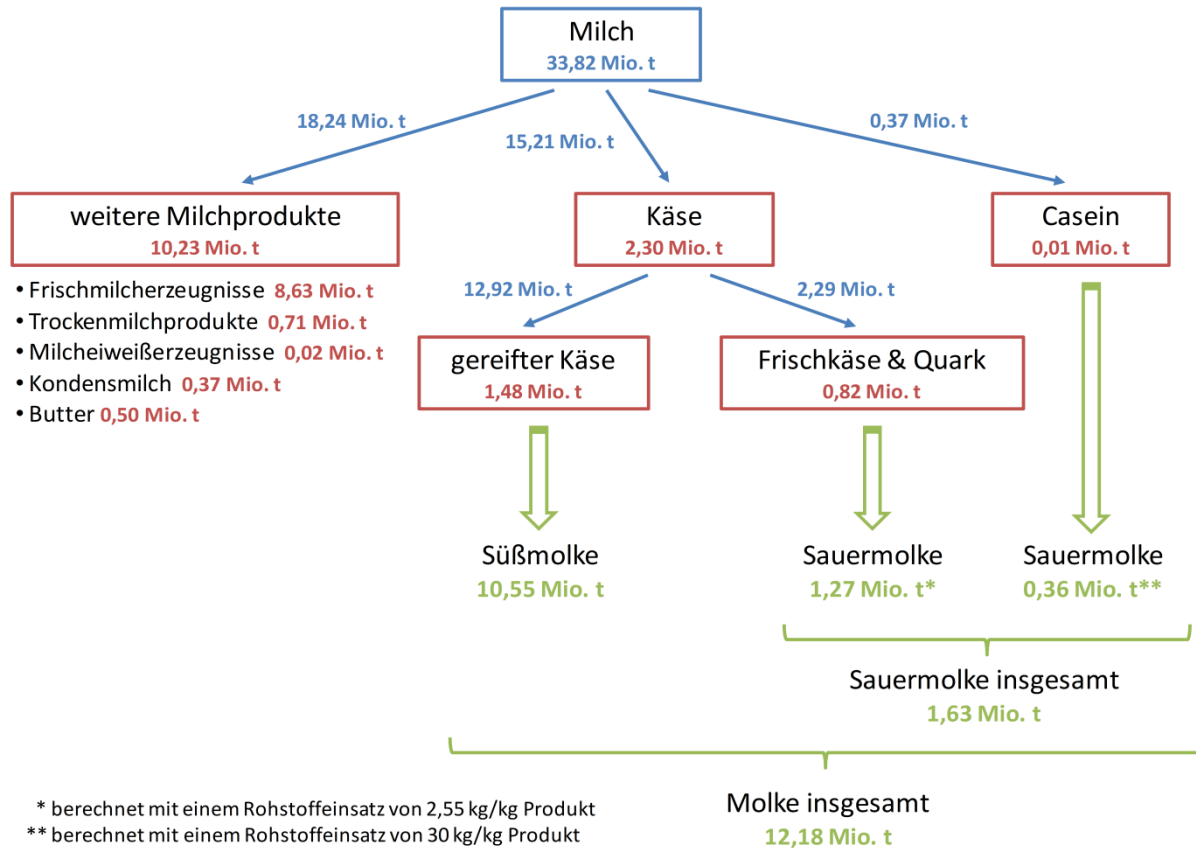
**Tabelle 2-3:** Molkenaufkommen weltweit im Vergleich zu den USA, Europa und Deutschland, bezogen auf die Trockenmasse, n. b. = nicht bekannt.

Region	Jahr der Erhebung	Molkenaufkommen [kt Trockenmasse]			Ref.
		Molke gesamt	Süßmolke	Sauermolke	
Weltweit	2014–2016	≥ 12.134 <sup>a</sup>	≤ 12.134	n. b.	[34]
USA	2012	2.783	2.668	115	[26]
Europa	2016	4.741 <sup>b</sup>	≤ 4.030	≥ 711	[37]
Deutschland	2017	730 <sup>c</sup>	635	95	[27]

<sup>a</sup> berechnet aus der Käseproduktion (nicht näher spezifiziert) von 22.471 kt (Mittel 2014–2016), einem Käse:Molke-Verhältnis von 1:9 und einer Molke-TM von 6 %. Werte für Caseinproduktion nicht genannt. <sup>b</sup> berechnet aus der Käseproduktion (Hart- und Frischkäse) von 4.030 kt (entspricht 85 %) plus Casein-Sauermolke (15 %). <sup>c</sup> berechnet mit 6 % TM aus 12.179 kt Molke.

<sup>1</sup> Berechnet aus der Verwendung von 370,8 kt Magermilch zur Herstellung von Casein in Deutschland (2016), einer kg Rohstoff/kg Produkt-Rate von 30 (ergibt ca. 358 kt Molke) und einem Gesamtmolkeanfall von 12.521 kt in Deutschland (2016).

In Deutschland wurden 2017 insgesamt ca. 33,8 Mio. Tonnen Milch verarbeitet [27], wovon etwa 45 % in der Käseproduktion eingesetzt wurden (Abbildung 2-1). Die Herstellung von Casein spielt mit einem Rohstoffeinsatz von ca. 1,1 % (370.800 Tonnen Milch) nur eine untergeordnete Rolle. Der daraus resultierende Molkenanfall lag 2017 somit bei insgesamt ca. 12,2 Mio. Tonnen, wovon etwa 13 % auf Sauermolke entfielen.



**Abbildung 2-1:** Eingesetzte Milchmenge (blau) für die Herstellung von Milchprodukten (rot) und daraus resultierender Molkenanfall (grün) in Deutschland (2017), Daten aus [27].

Der hohe biologische (BSB, ca. 30.000–35.000 mg/L) sowie chemische Sauerstoffbedarf (CSB, ca. 60.000–80.000 mg/L) von Molke [33, 40] übersteigt bei weitem die laut Abwasserverordnung zulässigen Höchstwerte (BSB<sub>5</sub>: 25 mg/L, CSB: 110 mg/L) für Molkereien [41]. Demnach ist es erstrebenswert, die anfallende Molke möglichst vollständig weiteren Verwertungsmöglichkeiten zuzuführen. Dennoch bleiben ca. 30 % (2007) des weltweiten Molkenaufkommens bisher industriell ungenutzt [42]. Für die USA liegt der Anteil ungenutzter Molke konstant zwischen 45,6–48,1 % (2000–2012) [26]. Für Europa wird ein ungenutzter Anteil von ca. 60 % (2006) angegeben [43].

Vor der Weiterverarbeitung wird Molke zunächst von Caseinstaub und Fett befreit und anschließend z. B. zu (teil- bzw. demineralisiertem) Molkenpulver, Molkenproteinkonzentrat (engl. WPC – *whey protein concentrate*) bzw. Molkenproteinisolat (engl. WPI – *whey protein isolate*) verarbeitet [24]. Diese Produkte besitzen, nicht zuletzt aufgrund der hohen biologischen Wertigkeit und Bioverfügbarkeit (PDCAAS) der Molkenproteine [29, 33], vielfältige Einsatzgebiete in der Lebensmittelindustrie, so z. B. in Wurstwaren, Backwaren, Milchprodukten, Sportler- und Säuglingsnahrung [44]. In Europa sowie Deutschland werden daher ca. 50 % der TM der anfallenden Molke zu Molkenpulver verarbeitet [27]. Aus flüssiger Molke kann Molkenkäse (z. B. Ricotta [25]) produziert werden. Eine Einarbei-



tung in Getränke ist ebenso möglich [44, 45], meist durch Verschneiden mit Fruchtsäften [32, 46] oder eine Fermentation mit Joghurt-Kulturen oder probiotischen Stämmen [45], ggf. unter Zugabe weiterer Zutaten [47]. Molke wird auch für die Herstellung alkoholischer Getränke wie Molke-Bier [48, 49] oder Vodka (Black Cow Vodka von Pure Milk Vodka LTD [50]) genutzt. Alternativ kann Molke (bzw. Molkenpermeat) auch als Fermentationsmedienzusatz für Mikroorganismen dienen, welche Lactose als Kohlenstoffquelle nutzen können. Beispiele sind die fermentative Gewinnung von Milchsäure [51, 52],  $\beta$ -Galactosidase [53-57] und Lactobionsäure [58], die Optimierung der Biomasseproduktion [59] oder auch die Erzeugung von Biogas [60]. Weiterhin wird Molke als Dünger [61, 62] sowie Futtermittel eingesetzt. In den USA werden ca. 1/3 aller hergestellten Molkenprodukte (konzentrierte Molke, Molkenpermeat, Molkenpulver, WPC, WPI, Lactose) als Tierfutter verwendet, wobei Molkenpermeat mit knapp 40 % den größten Anteil ausmacht [26]. In Europa wurden 2017 ca. 8.964 kt Molke (inkl. eingedickte Molke) verfüttert, in Deutschland waren es ca. 2.204 kt. Dies entspricht näherungsweise<sup>2</sup> einem Anteil von 15–20 % des Gesamtmolkenaufkommens.

## 2.2 $\beta$ -Galactosidasen

### 2.2.1 Aufbau und Eigenschaften

Das Enzym  $\beta$ -Galactosidase gehört zur Klasse der Hydrolasen (EC 3.2.1.13) und wird oft auch als Lactase bezeichnet<sup>3</sup>. Es katalysiert die Spaltung (aber auch die Neubildung) von glykosidischen Bindungen. Neben dem natürlichen Substrat Lactose können auch die chromogenen Substrate o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (oNPG) bzw. p-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (pNPG) umgesetzt werden [63], welche häufig zur Bestimmung der Enzymaktivität herangezogen werden [64].

Je nach Mikroorganismus liegt das Enzym zellwandgebunden (z. B. *Cryptococcus laurentii* [65]), intrazellulär (z. B. *Lactobacillus reuteri* [66]) oder extrazellulär (z. B. *Aspergillus niger* [67]) vor. Die Molekülmasse variiert von einigen kDa bis zu mehreren Hundert kDa (siehe Tabelle A.7-1). Hierbei handelt es sich meist um monomere (z. B. aus *A. niger* [67]), dimere (z.B. verschiedene *Lactobacillus*-Spezies [66, 68-72] oder tetramere (z. B. aus *Escherichia coli* [73]) Enzyme, aber auch tri- und hexamere sind möglich [63].

Während die meisten Lactasen im mesophilen Temperaturbereich wirken (siehe Abbildung A.7-1), wurden auch solche aus psychrophilen (z. B. aus *Arthrobacter psychrolactophilus* [74]) und thermophilen (z. B. aus *Thermus thermophilus* [75], *Thermus aquaticus* [76] und *Thermotoga maritima* [77]) Mikroorganismen isoliert und charakterisiert. Das pH-Optimum liegt meist im neutralen Bereich von ca. 6,0–8,0 (siehe Abbildung A.7-2). Wenige  $\beta$ -Galactosidasen sind auch im sauren pH-Milieu aktiv (z. B. aus *Aspergillus oryzae* [78], *C. laurentii* [65] und *Sirobasidium magnum* [79]). Es sei darauf hingewiesen, dass sich die Aktivitätskurve (und damit unter Umständen das jeweilige Optimum) mit dem Substrat Lactose im Vergleich zu synthetischen Substraten wie pNPG oder oNPG unterscheiden kann [69, 71, 72, 80-85]. In extremen Fällen überschneiden sich die Wirkbereiche kaum (z. B. Maximum mit pNPG bei pH 4,5 und mit Lactose bei pH 7,5, *Bifidobacterium angulatum*-Zellen [21]). Für eine Lactase aus *Lactobacillus crispatus* wurde hingegen kein Unterschied zwischen

<sup>2</sup> Anteil eingedickter Molke nicht bekannt.

<sup>3</sup> Beide Begriffe werden in dieser Arbeit synonym verwendet.

Lactose- und oNPG-Aktivität festgestellt [86]. Eine sehr gute Übereinstimmung wurde auch mit *A. oryzae* erhalten [78].

### 2.2.2 Inhibitoren und Aktivatoren in Milch und Molke

Vor allem Salze, aber auch Molkenproteine und Caseine können die Aktivität und Stabilität von  $\beta$ -Galactosidasen beeinflussen. Dies soll im nachfolgenden Abschnitt näher betrachtet werden.

Während die Wirkung der Effektoren naturgemäß von der jeweiligen Enzymquelle sowie der eingesetzten Konzentration und den verwendeten Puffern (mögliche synergistische Effekte) abhängt, so kommt dennoch der Großteil der Studien zu dem Schluss, dass Natrium, Kalium und Magnesium als Aktivatoren fungieren, Calcium jedoch die Enzymaktivität herabsetzt (siehe Tabelle A.7-2). Nichtsdestotrotz bewirkte Calcium bei *Bacillus circulans* (1–5 mmol/L) [3] und *T. maritima* (1 mmol/L) [77] eine Steigerung der  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität, wobei die untersuchten Konzentrationen im Vergleich zu den beispielsweise in Sauermolke vorhandenen Calciumgehalten [87] relativ niedrig sind. Weder Calcium, noch Magnesium (jeweils 1 mmol/L und 10 mmol/L) hatten einen Effekt auf eine Lactase aus *Bacillus licheniformis* jeweils in Kombination mit 10 mmol/L Natrium bzw. Kalium [85]. Hingegen wurde für *Streptococcus thermophilus* [88, 89] und andere Milchsäurebakterien [89] ein komplexes Zusammenspiel von Natrium, Kalium und Magnesium aufgezeigt, was die Vorhersage des Enzymverhaltens in Substraten wie Milch und Molke erheblich erschwert. Einige Enzyme, wie z. B.  $\beta$ -Galactosidase aus *Kluyveromyces lactis*, sind auf das Vorhandensein monovalenter Kationen strikt angewiesen. Dennoch kann es bei Vorhandensein mehrerer Ionen zu synergistischen Effekten kommen, welche die Enzymaktivität wiederum reduzieren [90]. Eine Erhöhung der Enzymstabilität wird vor allem Magnesium zugeschrieben (z. B. *Lactobacillus acidophilus* [68], *Lactobacillus bulgaricus* [72], *Lactobacillus plantarum* [70], *Lactobacillus pentosus* [71], *S. thermophilus* [91]).

Der Einfluss der Milchproteine auf die Aktivität von  $\beta$ -Galactosidasen ist weniger gut untersucht. Auch hier spielen synergistische Effekte mit den Milchsälsalzen eine Rolle, beispielsweise verdoppelte Casein die Enzymaktivität einer *S. thermophilus*-Lactase in Anwesenheit von Milchsälsalzen [92], während ein Anstieg um nur 6 % in Puffer (0,1 mol/L Kalium-Phosphat pH 6,6 mit 3,2 mmol/L Magnesium) verzeichnet wurde. Auch Molkenproteine wirkten stimulierend und führten zu einem 14 %igen Aktivitätsanstieg. Ähnliche Ergebnisse wurden mit bovinem Serumalbumin (1,5 g/L) und *Bacillus stearothermophilus* [93] sowie Milchproteinen und *B. circulans* [3] erhalten. Allerdings sind auch negative Einflüsse z. B. auf Enzyme aus *E. coli* und *K. lactis* [3] bekannt. Weiterhin zeigten Molkenproteine keine Wirkung bei *A. oryzae* [94].

Betrachtet man die Substrate Milch und Molke als Gesamtheit, zeigen sich in Abhängigkeit der Enzymquelle erhebliche Unterschiede hinsichtlich der Beeinflussung der Enzymaktivität (Tabelle 2-4). So reduzierte sich die Aktivität einer *S. thermophilus*- $\beta$ -Galactosidase in Milch und Süßmolke um knapp 70 % [92]. Andererseits wies das Enzym eine erhöhte Stabilität in Milch auf, was von Chang & Mahoney [91] auf die Caseine zurückgeführt wurde. Auch bei  $\beta$ -Galactosidasen aus *B. stearothermophilus* und *E. coli* wirkte das Medium Milch deutlich aktivitätssenkend (Tabelle 2-4). Ähnliches wurde mit *A. niger* in Sauermolke und Sauermolkenpermeat beobachtet [87]. Demgegenüber konnte mit *B. circulans* eine leichte Aktivitätssteigerung in Milch detektiert werden [3]. Für *K. lactis* fanden Kim et al. [95] eine höhere Aktivität und auch Stabilität des Enzyms in Milch, was im

Widerspruch zu den Ergebnissen von Mozaffar et al. [3] steht. Ebenfalls positiv wirkte sich konzentriertes Molkenpermeat auf eine *L. reuteri*- $\beta$ -Galactosidase aus [96].

**Tabelle 2-4:** Einfluss von Milch und Molke auf die relative Enzymaktivität im Vergleich zum Referenzmedium.

Enzymquelle	Medium	Referenzmedium <sup>a</sup>	Enzym-aktivität [%]	Ref.
<i>B. circulans</i> <sup>b</sup>	Milch pH 6,6	20 mmol/L K-Phosphat pH 6,5	118	[3]
<i>B. stearo-thermophilus</i> <sup>bc</sup>	Milch pH 6,86	50 mmol/L Na-Phosphat pH 7,0	25	[97]
<i>E. coli</i> <sup>d</sup>	Milch pH 6,6	25 mmol/L K-Phosphat pH 6,6	20	[3]
<i>K. lactis</i> <sup>e</sup>	Milch pH 6,6	25 mmol/L K-Phosphat pH 6,6	70	[3]
<i>K. lactis</i> <sup>e</sup>	Milch pH 6,5	20 mmol/L K-Phosphat pH 6,5	110	[95]
<i>S. thermophilus</i> <sup>f</sup>	Milch pH 6,6	0,1 mol/L K-Phosphat + 3,2 mmol/L MgCl <sub>2</sub> pH 6,6	33	[92]
<i>B. stearo-thermophilus</i> <sup>bc</sup>	demineralisierte Süßmolke pH 6,55	50 mmol/L Na-Phosphat pH 7,0	97	[97]
<i>L. reuteri</i> <sup>g</sup>	konz. Molken- permeat pH 5,8	50 mmol/L Na-Phosphat pH 6,5	180	[96]
<i>S. thermophilus</i> <sup>f</sup>	Süßmolke pH 6,6	0,1 mol/L K-Phosphat + 3,2 mmol/L MgCl <sub>2</sub> pH 6,6	32	[92]
<i>A. niger</i> <sup>h</sup>	Sauermolke pH 4,5	0,1 mol/L Na-Acetat pH 4,5	44	[87]
<i>A. niger</i> <sup>h</sup>	Sauermolken- permeat pH 4,5	0,1 mol/L Na-Acetat pH 4,5	44	[87]

<sup>a</sup> enthält gleiche oder ähnliche Konzentration an Lactose. <sup>b</sup> *Bacillus* sp. <sup>c</sup> immobilisiertes Enzym. <sup>d</sup> *Escherichia* sp. <sup>e</sup> *Kluyveromyces* sp. <sup>f</sup> *Streptococcus* sp. <sup>g</sup> *Lactobacillus* sp. <sup>h</sup> *Aspergillus* sp.

### 2.2.3 Einfluss von Glucose und Galactose

Neben Salzen können auch die Lactose-Spaltprodukte Glucose und Galactose inhibierend wirken. Im Allgemeinen ist Galactose aufgrund der besseren Passfähigkeit am aktiven Zentrum ein stärkerer Inhibitor als Glucose [66, 69] und wird daher meist als kompetitiver Inhibitor identifiziert (Tabelle 2-5). Gemessen am  $K_i/K_m$ -Verhältnis, welches die Affinität des Enzyms zum Inhibitor im Vergleich zum Substrat widerspiegelt, ist die Hemmung durch beide Monomere jedoch generell nicht sehr stark und wird für Werte von 2,9 (*L. reuteri*) und 3,7 (*L. bulgaricus*) als moderat bzw. für Werte von 9 (*L. sakei*) als nicht ausgeprägt bezeichnet.

Bei Glucose scheint eine gewisse Abhängigkeit des Hemmmechanismus von der Enzymquelle vorzuliegen. Für Lactasen der Spezies *Lactobacillus* wurde einheitlich von einer kompetitiven Hemmung berichtet [66, 69, 72], andere Autoren berichten von nicht kompetitiver [98, 99] bzw. unkompetitiver Inhibierung [100]. Aufgrund dessen, dass die Bestimmung der Enzymaktivität gegenüber Lactose durch Messung der freigesetzten Glucose erfolgt, wird bei der Untersuchung der Inhibitorwirkung von Glucose das synthetische Substrat oNPG verwendet. Wie beispielsweise mit dem Inhibitor Galac-

tose gezeigt wurde [72], kann jedoch die ermittelte Hemmwirkung ( $K_i/K_m$ ) mit oNPG von der mit Lactose abweichen (Tabelle 2-5).

**Tabelle 2-5:** Inhibitorwirkung von Glucose und Galactose auf  $\beta$ -Galactosidasen (freies Enzym) aus verschiedenen Quellen, n. b. = nicht bestimmt.

Enzymquelle	Substrat	$K_m^d$ [mmol/L]	Inhibitor	$K_i^e$ [mmol/L]	$K_i/K_m$	Mechanismus	Ref.
<i>A. oryzae</i> <sup>a</sup>	oNPG	n. b.	Galactose	n. b.	n. b.	kompetitiv	[101]
<i>K. lactis</i> <sup>b</sup>	oNPG	3,6	Galactose	45	12,5	kompetitiv	[98, 99]
<i>K. lactis</i> <sup>b</sup>	oNPG	3,6	Glucose	758	210,5	nicht kompetitiv	[98, 99]
<i>K. marxianus</i> <sup>b</sup>	Lactose	47,5	Galactose	72	1,5	unkompetitiv	[100]
<i>K. marxianus</i> <sup>b</sup>	Lactose	47,5	Glucose	57	1,2	unkompetitiv	[100]
<i>L. bulgaricus</i> <sup>c</sup>	Lactose	19,2	Galactose	70,7	3,7	kompetitiv	[72]
<i>L. bulgaricus</i> <sup>c</sup>	oNPG	0,92	Galactose	9,25	10	kompetitiv	[72]
<i>L. bulgaricus</i> <sup>c</sup>	oNPG	0,92	Glucose	123	134	kompetitiv	[72]
<i>L. reuteri</i> <sup>c</sup>	oNPG	0,98	Galactose	155	158	kompetitiv	[66]
<i>L. reuteri</i> <sup>c</sup>	oNPG	0,98	Glucose	683	697	kompetitiv	[66]
<i>L. reuteri</i> <sup>c</sup>	Lactose	31	Galactose	89	2,9	kompetitiv	[66]
<i>L. sakei</i> <sup>c</sup>	Lactose	20	Galactose	180	9	kompetitiv	[69]
<i>L. sakei</i> <sup>c</sup>	oNPG	0,60	Glucose	475	790	kompetitiv	[69]

<sup>a</sup> *Aspergillus* sp. <sup>b</sup> *Kluyveromyces* sp. <sup>c</sup> *Lactobacillus* sp. <sup>d</sup>  $K_m$  = Michaelis-Menten-Konstante. <sup>e</sup>  $K_i$  = Inhibitor-Konstante.

Kim et al. [102] zeigten für  $\beta$ -Galactosidase aus *K. lactis*, dass auch die Substrat- und Effekorkonzentration für die (potenziell) inhibierende Wirkung eine Rolle spielen. Ein hemmender Einfluss von Galactose auf die Lactosehydrolyse konnte nur bei Konzentration jeweils unterhalb von 50 mmol/L nachgewiesen werden. Ab einer Lactosekonzentration von 100 mmol/L (dies entspricht der Größenordnung der Lactosekonzentration in Milch und Molke) wurde sogar eine aktivierende Wirkung festgestellt. Im Gegensatz zu Mateo et al. [98] stellten sie auch eine konzentrationsabhängige, aktivierende Wirkung von Glucose auf die oNPG-Hydrolyse fest, vermutlich aufgrund deren guten Eignung als Akzeptormolekül. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch Warmerdam et al. [103] mit  $\beta$ -Galactosidasen aus *K. lactis*, *A. oryzae* und *B. circulans*. Für Galactose detektierten sie einen inhibierenden Einfluss nur für *K. lactis* und *A. oryzae*, während mit *B. circulans* ein Anstieg der oNPG-Aktivität gemessen wurde, was darauf hindeutet, dass auch Galactose von diesem Enzym als Akzeptormolekül genutzt werden kann.

Das Vorhandensein dieser Inhibitoren während der GOS-Synthese lässt sich aufgrund des Reaktionsmechanismus nicht bzw. nur mit erhöhtem Aufwand (z. B. kontinuierliche Produktabtrennung mittels Membranfiltration [18], Einsatz zusätzlicher Enzyme [104]) vermeiden.

## 2.2.4 Kommerzielle $\beta$ -Galactosidase-Präparate

Hauptsächlich werden  $\beta$ -Galactosidasen aus *A. oryzae* und *K. lactis* produziert, welche ihr Wirkoptimum im sauren bzw. neutralen pH-Bereich haben (Tabelle 2-6). Damit eignen sich die erstgenannten auch für den Einsatz in fermentierten Produkten [105].

**Tabelle 2-6:** Übersicht kommerziell erhältlicher  $\beta$ -Galactosidase-Präparate inklusive den vom Hersteller angegebenen optimalen Aktivitätsparametern (Temperatur, pH), k. A. = keine Angabe.

Markenname	Hersteller	Enzymquelle	T [°C] <sup>a</sup>	pH <sup>a</sup>	Ref.
Lactazyme A™	GenoFocus Inc.	<i>Aspergillus niger</i>	55-60	4,5	[106]
Biolactase F Conc	Biocon Española S.A.	<i>Aspergillus oryzae</i>	55	5,0	[107]
Dairyzym F 50 P	SternEnzym GmbH & Co. KG	<i>Aspergillus oryzae</i>	50	4,5	[108]
Maxilact® A4	DSM Food Specialties B.V.	<i>Aspergillus oryzae</i> <sup>b</sup>	55	4,2	[109]
opti-lactase A50	Optiferm GmbH	<i>Aspergillus oryzae</i>	55	4,5	[110]
Lactazyme B™	GenoFocus Inc.	<i>Bacillus circulans</i>	50	6,0	[111]
NOLA™ Fit 5500	Chr. Hansen Holding A/S	<i>Bifidobacterium bifidum</i> <sup>c</sup>	35-50 <sup>d</sup>	6,0	[105]
Saphera®	Novozymes A/S	<i>Bifidobacterium bifidum</i> <sup>c</sup>	50 <sup>d</sup>	6,0	[112]
BIOLACTASE NL	Biocon Española S.A.	<i>Kluyveromyces lactis</i>	45	4,8	[113]
Dairyzym Y 50 L	SternEnzym GmbH & Co.KG	<i>Kluyveromyces lactis</i>	45	6,5	[114]
Ha-Lactase™	Chr. Hansen Holding A/S	<i>Kluyveromyces lactis</i>	45	6,5	[115]
Maxilact® LX5000	DSM Food Specialties B.V.	<i>Kluyveromyces lactis</i>	k. A.	k. A.	[116]
Lactozym® Pure	Novozymes A/S	<i>Kluyveromyces lactis</i>	k. A.	k. A.	[117]
opti-lactase LX2	Optiferm GmbH	<i>Kluyveromyces lactis</i>	45	6-8	[118]
Maxilact® Smart	DSM Food Specialties B.V.	k. A.	k. A.	k. A.	[119]

<sup>a</sup> optimale Enzymaktivität. <sup>b</sup> rekombinant mit *Aspergillus niger* hergestellt. <sup>c</sup> rekombinant mit *Bacillus licheniformis* hergestellt. <sup>d</sup> Behandlung von milchbasierten Substraten auch bei > 60°C möglich [120].

Während die meisten Enzympräparate allein für die Lactosehydrolyse und folglich als Hilfsmittel zur Herstellung lactosefreier Produkte beworben werden, erwähnt DSM Food Specialties B.V. im Datenblatt zu Maxilact® A4 aus *A. oryzae*, dass die Produktion von Galactooligosacchariden – vor allem in hochkonzentrierten Lactoselösungen wie Sauermolkenpermeat – in signifikanten Mengen möglich ist [109]. Konkret für die Synthese von GOS wird jedoch nur Lactazyme B™ aus *B. circulans* der Firma GenoFocus Inc. beworben. Sie geben eine Ausbeute von 58–65 % und einen Restlactosegehalt von weniger als 10 % bei Einsatz einer 50 %-igen Lactoselösung an [111].

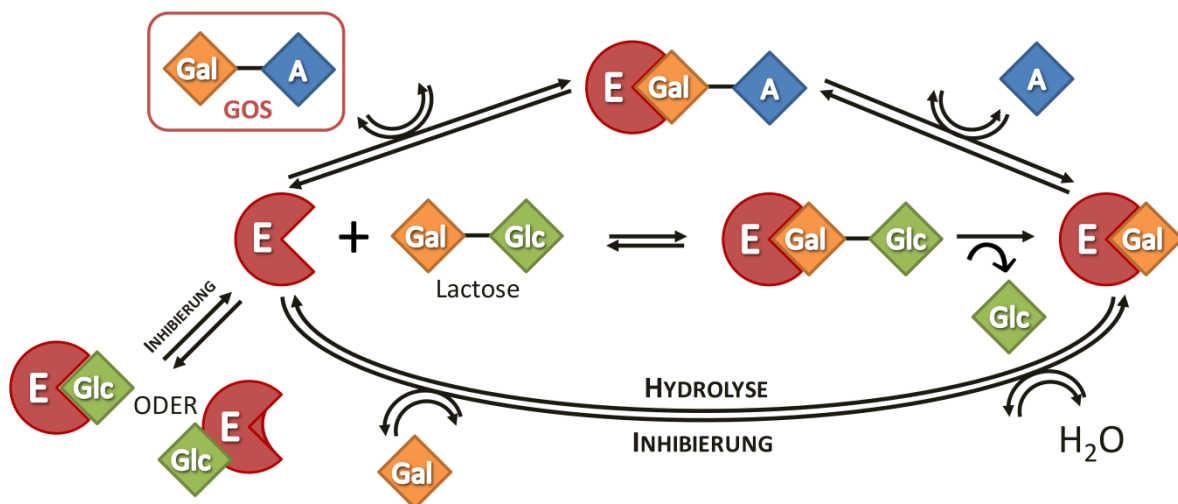
Die Produkte Saphera® von Novozymes A/S bzw. NOLA™ Fit 5500 von Chr. Hansen Holding A/S entsprechen der von Arla Foods amba entwickelten (verkürzten) und patentierten  $\beta$ -Galactosidase aus *B. bifidum* DSM 20215, welche in wässriger Lactoselösung eine stark ausgeprägte Transgalactosylierungsaktivität aufweist [121]. In Milch zeigte das Enzym jedoch ausschließlich hydrolytische Aktivität [120]. Trotz des pH-Optimums bei 6,0 hat das Enzym im Vergleich zur *K. lactis*- $\beta$ -Galactosidase auch

bei pH 4,5–5,0 eine relative Aktivität von über 50 %, sodass es speziell für den Einsatz zur Herstellung lactosereduzierter, fermentierter Lebensmittel beworben wird.

## 2.3 Galactooligosaccharide

### 2.3.1 Definition und Syntheseweg

Nach Tzortzis & Vulevic [122] sind Galactooligosaccharide (GOS) definiert als ein Gemisch von Zuckern, welche aus dem Substrat Lactose gewonnen werden und aus zwei bis acht Monomeren bestehen, wobei das endständige Molekül Glucose ist und alle weiteren Einheiten Galactose sind. Dazu zählen außerdem Disaccharide, die aus zwei Galactose-Molekülen aufgebaut sind. Obwohl theoretisch möglich, gibt es bisher nur eine Publikation, die auch Trigalactosen nachgewiesen hat [123].



**Abbildung 2-2:** Vereinfachte schematische Darstellung der GOS-Synthese (E = Enzym β-Galactosidase, Gal = Galactose, Glc = Glucose, A = Akzeptormolekül), in Anlehnung an [124].

Galactooligosaccharide entstehen während der Spaltung von Lactose durch das Enzym β-Galactosidase (Abbildung 2-2). Nach der Bildung eines Lactose-Enzym-Komplexes wird zunächst Glucose freigesetzt, der Galactosyl-Rest verbleibt jedoch am aktiven Zentrum. Dieser wird anschließend auf ein Akzeptormolekül mit einer OH-Gruppe übertragen. Handelt es sich hierbei um Wasser, so findet eine einfache Hydrolyse statt und freie Galactose entsteht. Ist jedoch ein anderes Zuckermolekül der Akzeptor, entstehen GOS (sogenannte Transgalactosylierung). Bei diesem „anderen“ Zuckermolekül kann es sich um alle in der Reaktionslösung vorhandenen Zucker handeln, d. h. sowohl das Substrat selbst (Lactose) als auch die aus der Hydrolyse-Reaktion entstandenen Monosaccharide Glucose und Galactose, aber auch bereits gebildete GOS. Dadurch kommt es im Verlauf der Reaktion zur Kettenverlängerung. Neben dieser intermolekularen Reaktion können glucosehaltige GOS-Disaccharide wie beispielsweise Allolactose (Gal-β(1→6)-Glc) auch via intramolekularer Synthese gebildet werden, bei der Glucose nicht freigesetzt wird, sondern es zur sofortigen Neubildung der glykosidischen Bindung kommt [125]. In einer kürzlich erschienenen Publikation [126] konnte allerdings für die β-Galactosidasen aus *A. oryzae*, *B. circulans* und *K. lactis* gezeigt werden, dass die Synthese von glucosehaltigen GOS-Disacchariden entgegen der vorherigen Annahme auch durch intermolekulare

Reaktion erfolgen kann. Die Bildung entsprechender Strukturen war erst im späteren Reaktionsverlauf (d. h. nach Vorhandensein genügend freier Glucose) möglich.

Weiterhin handelt es sich bei Galactooligosacchariden nur um ein Zwischenprodukt, da diese selbst als Substrat fungieren können und – sofern die Reaktion kinetisch kontrolliert ist, d. h. keine Beeinträchtigung/Inaktivierung des Enzyms vorliegt – folglich mit zunehmender Reaktionsdauer wieder vollständig abgebaut werden. Demnach ist es von immenser Wichtigkeit, den Reaktionsverlauf zeitlichen zu verfolgen, um das Ausbeutemaximum ermitteln zu können [127, 128]. Auch hier konnte jedoch vor Kurzem gezeigt werden, dass es eine gewisse Abhängigkeit von der eingesetzten Enzymquelle gibt und der GOS-Abbau nicht immer vollständig sein muss. Während  $\beta$ -Galactosidasen aus *A. oryzae* und *K. lactis* die zuvor erzeugten GOS wieder nahezu komplett hydrolysierten, blieben viele der von *B. circulans* generierten Di- und Trisaccharide auch nach langer Inkubationsdauer und trotz nachgewiesener Restaktivität des Enzyms von ca. 40 % erhalten [126].

Als Maß für die Transgalactosylierungsaktivität eines Enzyms wird im Allgemeinen das Verhältnis von freigesetzter Glucose zu freigesetzter Galactose (Glc/Gal-Faktor) betrachtet. Bei Werten knapp über 1,0 dominiert die Hydrolyse-Reaktion und das Enzym weist folglich nur eine geringe Transferaktivität auf. Allerdings hat die Kategorisierung anhand dieses Faktors den Nachteil, dass trotz deutlicher GOS-Bildung Werte in der Nähe von 1,0 erhalten werden können, was fälschlicherweise auf eine geringe Eignung für die Synthese von Galactooligosacchariden deuten würde (z. B. Glc/Gal = 1,1 für *L. reuteri* trotz 28 % Ausbeute bei 205 g/L Lactose [96], Glc/Gal = 1,2 für *K. lactis* trotz 15,2 % Ausbeute bei 46 g/L Lactose [20]). Dies ist der Fall bei  $\beta$ -Galactosidasen, die verstärkt Glucose als Akzeptormolekül verwenden (so z. B. *K. lactis* [102] und *L. reuteri* [129]), sodass verhältnismäßig wenig freie Glucose in der Reaktionslösung verbleibt.

Eine andere Möglichkeit ist die Angabe des GOS/reacLac-Verhältnisses, d. h. des Anteils an tatsächlich umgesetzter Lactose, der zu GOS umgewandelt wurde. Ein Wert von 1,0 würde demnach bedeuten, dass keine Hydrolyse, sondern ausschließlich Transgalactosylierung stattgefunden hat [130]. Allerdings kann analytisch nur der Restlactosegehalt (zum Zeitpunkt maximaler GOS-Konzentration) erfasst werden (aus welchem sich der Anteil an umgesetzter Lactose ergibt), d. h. es wird alles das als umgesetzte Lactose angesehen, was tatsächlich vom Enzym umgewandelt wurde, aber auch Lactose, die lediglich als Akzeptormolekül fungierte. Demnach wird das tatsächliche Verhältnis von Hydrolyse zu Transgalactosylierung in gewisser Weise überbewertet. Einige Autoren verwenden diesen Faktor (ausgedrückt in Prozent) als alternatives Maß für die GOS-Ausbeute [131, 132]. Im Gegensatz zur weitaus üblicheren Angabe der GOS-Ausbeute als Prozent des Gesamtzuckers bzw. des GOS-Gehaltes bezogen auf die anfängliche Lactosekonzentration, sinkt die auf den Lactoseumsatz bezogene Ausbeute bei Auftragung gegen selbigen stetig [131, 132].

Yin et al. [126] nutzten das Verhältnis von GOS zu freier Galactose (GOS/Gal-Faktor), um die Transgalactosylierungsaktivität eines Enzyms zu beschreiben, d. h. je höher der Wert, desto höher die Transferaktivität der  $\beta$ -Galactosidase. Werte kleiner 1,0 würden auf eine sehr hohe hydrolytische Aktivität hindeuten. Dieser Faktor scheint am besten geeignet, die transgalactolytische Aktivität eines Enzyms zu beschreiben, da er das Zielprodukt (GOS) einbezieht und jegliche freie Galactose in der Reaktionslösung nur aus einer Hydrolyse-Reaktion stammen kann.

## 2.3.2 Einflussgrößen auf die Reaktion

### 2.3.2.1 Enzymquelle

Je nachdem aus welchem Mikroorganismus die  $\beta$ -Galactosidase gewonnen wurde, ist die Transgalactosylierungsaktivität des Enzyms unterschiedlich stark ausgeprägt (Tabelle 2-7). Beispielsweise wurde für die auch kommerziell verfügbaren Enzyme aus *B. circulans*, *K. lactis* und *A. oryzae* ein GOS/Gal-Faktor von 10,9, 2,1 und 1,5 gemessen [126], wonach die  $\beta$ -Galactosidase aus *A. oryzae* die geringste GOS-Syntheseleistung aufweist und die  $\beta$ -Galactosidase aus *B. circulans* in besonderem Maße geeignet ist. Letztere wird auch für die Herstellung der meisten GOS-Produkte (siehe Kapitel 2.3.8) eingesetzt. Beispiele für weitere GOS/Gal-Faktoren für bisher unverkäufliche bzw. vorrangig in der Forschung eingesetzte  $\beta$ -Galactosidasen sind Tabelle 2-7 zu entnehmen. Ein direkter Vergleich verschiedener Enzyme ist jedoch durch die Verwendung unterschiedlicher Lactosekonzentrationen nicht immer möglich, da diese ebenfalls die Transgalactosylierungsaktivität beeinflusst.

**Tabelle 2-7:** Transgalactosylierungsaktivität einiger  $\beta$ -Galactosidasen gemessen anhand des GOS/Gal-Faktors.

Enzymquelle	ILC [g/L] <sup>a</sup>	GOS/Gal-Faktor	Ref.
<i>Aspergillus oryzae</i>	300	1,5	[126]
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	450	3,4	[133]
<i>Bacillus circulans</i>	500	10,9	[126]
<i>Kluyveromyces lactis</i>	300	2,1	[126]
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	300	2,7	[134]
<i>Lactobacillus lactis</i>	300	3,3	[134]
<i>Pantoea anthophila</i>	400	1,4–1,7	[135]
<i>Sterigmatomyces elviae</i>	300	10,6	[136]
<i>Streptococcus thermophilus</i>	300	4,3	[134]
<i>Thermus aquaticus</i>	160	3,0	[137]

<sup>a</sup> ILC = anfängliche Lactosekonzentration (engl. *initial lactose concentration*).

Die Enzymquelle definiert außerdem die Struktur der gebildeten GOS, sowohl hinsichtlich Kettenlänge als auch glykosidischer Bindung [127]. Während *B. circulans* die Bildung von  $\beta(1\rightarrow4)$ -glykosidischen Bindungen bevorzugt, so synthetisieren *K. lactis* und *A. oryzae* vorrangig  $\beta(1\rightarrow6)$ -Verknüpfungen [126]. Kürzlich untersuchte Stämme von *P. anthophila* zeigten eine ausgeprägte Synthese von  $\beta(1\rightarrow3)$ - und  $\beta(1\rightarrow6)$ -verknüpften GOS [135]. Hinsichtlich der Kettenlänge ist bekannt, dass  $\beta$ -Galactosidase aus *A. oryzae* kaum Di- und vorrangig Trisaccharide bildet, während beim Enzym aus *K. lactis* Di- und Trisaccharide etwa im Verhältnis 50:50 generiert werden [130]. Eine Übersicht über von verschiedenen  $\beta$ -Galactosidasen gebildete Strukturen findet sich bei Torres et al. [127].

Neben der Enzymquelle selbst kann auch die Form des Biokatalysators (aufgereinigtes Enzym, Rohextrakt, ganze Zellen, lebende Zellen) das Reaktionsergebnis beeinflussen. Beispielsweise zeigt der



Vergleich von gefriergetrockneten *B. bifidum*-Zellen zu Rohextrakten der jeweils rekombinant hergestellten Isoformen I-IV deutliche Ausbeuteunterschiede von bis zu 50 % (Tabelle 2-8). Ursache ist die unterschiedlich ausgeprägte Transgalactosylierungsaktivität der Isoformen sowie deren Zusammenspiel im Zellverband, welches wiederum vom Anteil der einzelnen Isoformen und deren Charakteristika abhängt und beispielsweise über die Reaktionstemperatur gesteuert werden kann [138]. Der protektive Effekt der Zellmembran kann sich positiv auf die Enzymstabilität auswirken, was bei *K. lactis*-Zellen zu geringfügig höheren GOS-Ausbeuten führte [139]. Ähnliches wurde auch für die *B. bifidum*-Zellen bei 40–45°C gezeigt. Bei höheren Temperaturen (50–75°C) erwiesen sich jedoch die frei vorliegenden Isoformen III und IV stabiler als im Zellverband [138].

**Tabelle 2-8:** Einfluss der Enzymform auf die GOS-Ausbeute.

Enzymquelle	Enzymform	ILC [g/L] <sup>a</sup>	GOS-Ausbeute [%]	Ref.
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Isoform I (Rohextrakt) <sup>b</sup>	750	41,6	[138]
	Isoform II (Rohextrakt) <sup>b</sup>	750	25,4	[138]
	Isoform III (Rohextrakt) <sup>b</sup>	750	50,2	[138]
	Isoform IV (Rohextrakt) <sup>b</sup>	750	54,8	[138]
	gefriergetrocknete Zellen	750	52,2	[138]
<i>Kluyveromyces lactis</i>	freies Enzym <sup>c</sup>	400	40,7-42,6	[139]
	permeabilisierte Zellen	400	44,2	[139]
<i>Lactobacillus reuteri</i>	aufgereinigtes Enzym	205	30	[96]
	Rohextrakt	205	30	[96]
<i>Sterigmatomyces elviae</i>	aufgereinigtes Enzym	200	39	[140]
	Toluen-behandelte Zellen	360	37,5	[136]
	lebende Zellen	360	64	[136]
<i>Sirobasidium magnum</i>	aufgereinigtes Enzym	200	36	[79]
	Toluen-behandelte Zellen	360	37,8	[104]
	lebende Zellen	360	62	[104]
<i>Rhodotorula minuta</i>	aufgereinigtes Enzym	200	39	[141]
	Toluen-behandelte Zellen	200	38	[142]
	lebende Zellen	360	64	[142]

<sup>a</sup> ILC = anfängliche Lactosekonzentration (engl. *initial lactose concentration*). <sup>b</sup> Isoformen rekombinant in *E. coli* hergestellt.

<sup>c</sup> kommerzielle Enzyme Lactozym 3000 LHPG und Maxilact LGX5000. Unterschied zu permeabilisierten Zellen ist nur auf die Enzymstabilität zurückzuführen und könnte bei entsprechender Anpassung der Reaktionsparameter ausgeglichen werden.

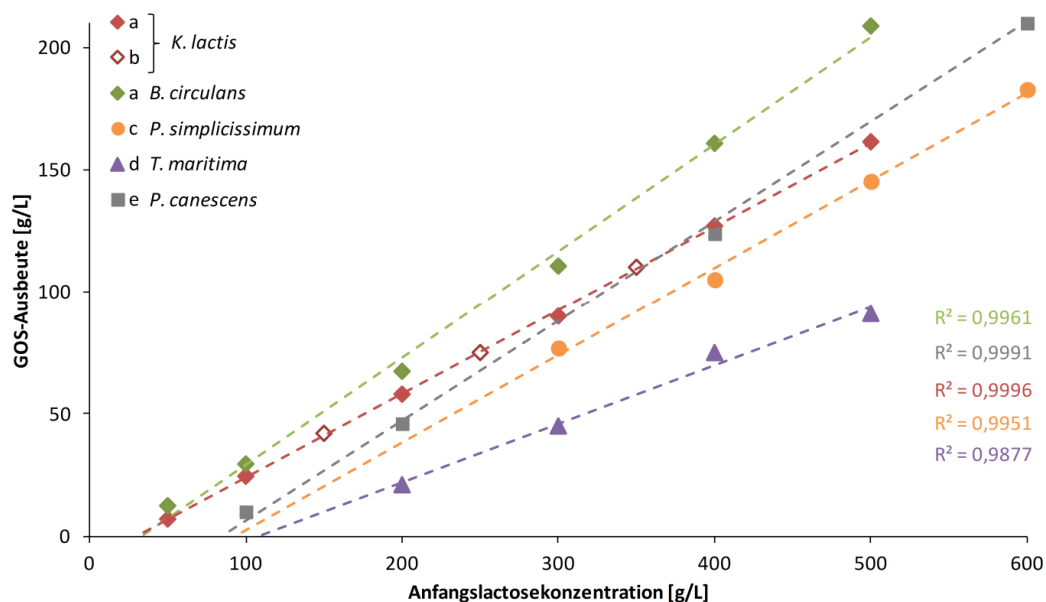
Bei  $\beta$ -Galactosidasen aus *S. elviae*, *S. magnum* und *R. minuta* konnte gezeigt werden, dass der Einsatz aufgereinigter Enzyme keinen Vorteil hinsichtlich der GOS-Ausbeute gegenüber Toluen-behandelten Zellen hat (Tabelle 2-8), womit sich zeit- und kostenintensive Downstream-Prozessschritte bei der Enzymherstellung einsparen ließen. Der Einsatz lebender Zellen führte hingegen zu einer deutlichen Steigerung der Ausbeute, vermutlich aufgrund der Verstoffwechselung der parallel entstehenden

Glucose [136]. Allerdings enthielten die Produktionsmedien weitere Salze sowie Hefeextrakt als komplexe N-Quelle, welche in nachfolgenden Prozessschritten wieder entfernt werden müssen, ebenso wie die im Prozess ansteigende Biomasse.

Demgegenüber stellt die Verwendung von Rohextrakten eine vielversprechende Alternative dar, allerdings können hierbei störende Nebenreaktionen auftreten. Für eine  $\beta$ -Galactosidase aus *L. reuteri* wurde jedoch kein Unterschied im Syntheseverhalten (GOS-Ausbeute als auch Lactosehydrolyse) bei Verwendung eines Rohextraktes im Vergleich zum aufgereinigten Enzym festgestellt. Auch trugen die im Rohextrakt vorhandenen Salze und Proteine zu einer verbesserten Enzymstabilität bei [96].

### 2.3.2.2 Lactosekonzentration

Die anfängliche Lactosekonzentration (engl. *initial lactose concentration* (ILC)) ist neben der Enzymquelle die wichtigste Einflussgröße auf die GOS-Ausbeute. Mit zunehmender Lactosekonzentration steigt auch die maximal erreichbare GOS-Konzentration [143-145], da die Wahrscheinlichkeit zunimmt, dass Lactose anstelle von Wasser als Akzeptormolekül fungiert [128] (lineare Abhängigkeit, Abbildung 2-3). Zu bemerken ist, dass die Geraden nicht durch den Koordinatenursprung verlaufen, da bei sehr geringen Lactosekonzentrationen die hydrolytische Aktivität dominiert [132]. Die Werte der Nullstellen dienen damit als Anhaltspunkt für die minimal benötigte Lactosekonzentration, um eine Transferaktivität hervorzurufen. Beispielsweise liegt diese mit ca. 108 g/L für *T. maritima* deutlich höher als für *K. lactis* (ca. 30 g/L, Abbildung 2-3). Weiterhin wird mit *A. oryzae* die maximale GOS-Ausbeute mit steigender ILC bei höheren Hydrolysegraden erreicht [132, 146, 147].



**Abbildung 2-3:** GOS-Ausbeute in Abhängigkeit von der eingesetzten Lactosekonzentration und Enzymquelle. Literaturdaten aus: a: Valero [147], b: Martínez-Villaluenga et al. [148], c: Cruz et al. [80], d: Ji et al. [149], e: Abelyan [19]. Trendlinie für *K. lactis* aus allen Daten a und b.

Die relative Ausbeute steigt vor allem im Bereich niedriger Lactosekonzentrationen von unter 200 g/L stark an [132] und erreicht unabhängig von der verwendeten Enzymquelle ab ca. 300 g/L eine Art Sättigung, wie Torres et al. [127] anhand Daten verschiedener Autoren zeigen konnten. Aufgrund der

relativ geringen Löslichkeit von Lactose im Vergleich zu anderen Zuckern (ca. 18,2 g/100 g Wasser bei 20°C [150]), ist die Steigerung der Anfangskonzentration jedoch limitiert. Daher ist es prinzipiell erstrebenswert – auch aus mikrobiologischer Sicht – die Synthese bei höheren Temperaturen zu betreiben. Dies setzt allerdings den Einsatz von thermophilen und thermostabilen Enzymen voraus.

### 2.3.2.3 Reaktionsbedingungen

Weitere in der wissenschaftlichen Fachliteratur untersuchte Reaktionsparameter sind pH-Wert, Temperatur und Enzym/Substrat-Verhältnis. Die Aussagekraft der berichteten Ergebnisse ist jedoch oftmals limitiert, da nicht immer zeitabhängige Untersuchungen durchgeführt wurden. Aufgrund des Einflusses dieser Parameter auf die Reaktionsgeschwindigkeit kann die Bestimmung der maximalen GOS-Ausbeute zu einem definierten Zeitpunkt nur eine Approximation hinsichtlich des jeweiligen Parameteroptimums darstellen. Entsprechende Untersuchungen wurden in den folgenden Tabellen gekennzeichnet. Ebenso sind manche Ausbeuteverminderungen aufgrund extremer Reaktionsbedingungen (z. B. zu hohe Temperaturen) lediglich auf eintretende Enzymdenaturierung zurückzuführen, weniger auf den Einfluss des Parameters selbst.

Der pH-Wert hat im Allgemeinen nur eine geringe Auswirkung auf die relative GOS-Ausbeute. Die meisten Autoren berichten von keinem bzw. nur einem geringem Effekt auf die GOS-Synthese (Tabelle 2-9). Dennoch gibt es zum Teil widersprüchliche Aussagen zwischen verschiedenen Autorengruppen. Beispielsweise fanden Zerge [151] und Valero [147] mit *B. circulans* auch bei niedrigen pH-Werten von 4,0–4,5 eine gleichbleibend hohe GOS-Ausbeute, während Das et al. [18] bei pH 4,0 eine um über 50 % verminderte Synthese detektierten. Ähnliches gilt für Untersuchungen mit *K. lactis*, wo einerseits die verminderte Ausbeute bei pH 7,5 auf eintretende Enzymdenaturierung zurückgeführt wurde [152], andererseits im Bereich 6,5–8,0 kein Einfluss festgestellt wurde [147]. Übereinstimmend wurde für den sauren pH-Bereich nur eine marginale GOS-Synthese von ca. 3 % sowohl bei pH 5,5 [148] als auch bei pH 5,0 [147] detektiert, was in etwa einem Zehntel der maximalen Ausbeute entspricht und auf einen deutlichen reduzierten Lactoseumsatz zurückgeführt werden kann. Valero [147] stellte für die häufig verwendeten  $\beta$ -Galactosidasen aus *A. oryzae*, *K. lactis* und *B. circulans* fest, dass weder die maximale Ausbeute noch die GOS-Zusammensetzung vom pH-Wert beeinflusst werden, sondern lediglich die Reaktionsgeschwindigkeit, wobei diese für *A. oryzae* bei pH 4,5, für *K. lactis* bei pH 6,5 und für *B. circulans* bei pH 6,0 maximal war. Ähnliches zeigte Abelyan [19] für eine  $\beta$ -Galactosidase aus *P. canescens*. Hinsichtlich des berichteten starken pH-Wert-Einflusses auf die GOS-Syntheseleistung von *P. simplicissimum* [80] wird vermutet, dass dieser durch die Wahl der Reaktionsbedingungen überschätzt wurde und die verringerte Ausbeute bei niedrigen pH-Werten auf einen bereits einsetzenden GOS-Abbau zurückzuführen ist (lange Reaktionszeit von 8 h, besserer und damit schnellerer Lactoseumsatz je niedriger der pH-Wert, höhere Konzentration an Monosacchariden je niedriger der pH-Wert).

**Tabelle 2-9:** Einfluss des pH-Wertes auf die relative GOS-Ausbeute sortiert nach Enzymquelle.

Enzymquelle	pH-Bereich	Effekt auf relative GOS-Ausbeute	Ref.
<i>A. oryzae</i> <sup>b</sup>	4,5–6,0	kein Einfluss	[132]
<i>A. oryzae</i> <sup>b</sup>	3,5–6,0	kein Einfluss	[147]
<i>A. oryzae</i> <sup>b</sup>	3,5–5,5	kein Einfluss	[146]
<i>A. oryzae</i> <sup>b</sup>	3,5–5,5	kein Einfluss	[101]
<i>B. circulans</i> <sup>c</sup>	4,0–7,0	geringer Einfluss	[151]
<i>B. circulans</i> <sup>c</sup>	4,5–7,5	kein Einfluss	[147]
<i>B. circulans</i> <sup>c</sup>	4,0–9,9	Optimum bei pH 6,6	[18]
<i>K. lactis</i> <sup>d</sup>	6,0–7,0	Optimum bei pH 6,0	[153]
<i>K. lactis</i> <sup>d</sup>	5,0–8,0	kein Einfluss (6,5–8,0), pH 5,0 verminderte Ausbeute	[147]
<i>K. lactis</i> <sup>d</sup>	5,5–7,5	kein Einfluss (6,5–7,5), pH 5,5 verminderte Ausbeute	[148]
<i>K. lactis</i> <sup>d</sup>	6,0–7,5	kein Einfluss (6,0–7,0), pH 7,5 verminderte Ausbeute	[152]
<i>K. marxianus</i> <sup>d</sup>	5,5–7,5 <sup>a</sup>	Optimum bei pH 6,0–6,5	[154]
<i>L. acidophilus</i> <sup>e</sup>	4,0–8,0	Optimum bei pH 5,0–7,0	[155]
<i>L. delbrueckii</i> <sup>e</sup>	5,0–9,0	Optimum bei pH 7,0	[156]
<i>L. reuteri</i> <sup>e</sup>	5,0–9,0	Optimum bei pH 7,0	[156]
<i>P. canescens</i> <sup>f</sup>	4,5–6,5	kein Einfluss	[19]
<i>P. expansum</i> <sup>f</sup>	3,6–8,2 <sup>a</sup>	kein Einfluss	[157]
<i>P. simplicissimum</i> <sup>f</sup>	2,6–7,0 <sup>a</sup>	starker Einfluss, Optimum bei pH 6,5	[80]
<i>T. maritima</i> <sup>f</sup>	5,0–8,0 <sup>a</sup>	Optimum bei pH 6,0	[149]

<sup>a</sup> Effekt im untersuchten Bereich wurde nur zu einer definierten Zeit gemessen und dient daher nur als Approximation.

<sup>b</sup> *Aspergillus* sp. <sup>c</sup> *Bacillus* sp. <sup>d</sup> *Kluyveromyces* sp. <sup>e</sup> *Lactobacillus* sp. <sup>f</sup> *Penicillium* sp. <sup>g</sup> *Thermotoga* sp.

Auch der Einfluss der Reaktionstemperatur auf die GOS-Synthese kann nicht verallgemeinert werden, sondern hängt von der jeweils verwendeten Enzymquelle ab (Tabelle 2-10). Für das Enzym aus *A. oryzae* wurde innerhalb eines breiten Temperaturbereichs von 4–60°C übereinstimmend keine Beeinflussung der GOS-Ausbeute festgestellt. Alle vier Isoformen von *B. bifidum* zeigten hingegen einen leichten Anstieg der GOS-Ausbeute mit steigender Temperatur mit Optima bei 55°C bzw. 65°C. Bei Verwendung ganzer Zellen war diese Abhängigkeit deutlich stärker ausgeprägt mit einem Anstieg der GOS-Ausbeute von ca. 29 % bei 40°C auf 51 % bei 65°C [138]. Der Lactoseumsatz selbst wurde nicht beeinträchtigt, was auf einen tatsächlichen Anstieg der Transgalactosylierungsaktivität bei Erhöhung der Temperatur hindeutet. Hinsichtlich des Temperatureinflusses auf die GOS-Ausbeute mit *B. circulans* sind die Aussagen divers. Während Gosling et al. [158] eine begünstigte GOS-Synthese mit Erhöhung der Temperatur aufgrund der Inaktivierung der zwei hydrolytisch aktiveren Isoformen fanden, kamen Bakken et al. [159] zu einem umgekehrtem Ergebnis. Ursache könnte die Enzymformulierung (frei vs. immobilisiert) und/oder Prozessführung (batch vs. kontinuierlich) sein. Für die Lactase aus *K. lactis* wurde übereinstimmend ein positiver Einfluss der Temperatur ermittelt, wobei die Enzyminaktivierung und damit eine Verminderung der GOS-Ausbeute ab 50°C [152] bzw.

60°C einsetzt [148]. Auch wird die prozentuale GOS-Zusammensetzung (Anteil an Di- und Trisacchariden) am Ausbeutemaximum beeinflusst [148]. Unabhängig von der Enzymquelle scheint es generell sinnvoll, bei erhöhten Temperaturen (z. B. am oNPG-Aktivitätsmaximum) unterhalb einsetzender Enzymdenaturierung zu arbeiten, da dies die Reaktionsgeschwindigkeit [19] und unter Umständen auch die GOS-Ausbeute positiv beeinflusst (Tabelle 2-10).

**Tabelle 2-10:** Einfluss der Reaktionstemperatur auf die relative GOS-Ausbeute sortiert nach Enzymquelle.

Enzymquelle	Temperatur-Bereich [°C]	Effekt auf relative GOS-Ausbeute	Ref.
<i>A. niger</i> <sup>b</sup>	8–50	kein Einfluss	[160]
<i>A. niger</i> <sup>b</sup>	40–50	kein Einfluss	[4]
<i>A. oryzae</i> <sup>b</sup>	4–40	geringer Einfluss	[20]
<i>A. oryzae</i> <sup>b</sup>	30–50	kein Einfluss	[132]
<i>A. oryzae</i> <sup>b</sup>	35–50	kein Einfluss	[101]
<i>A. oryzae</i> <sup>b</sup>	30–60	kein Einfluss	[146]
<i>A. oryzae</i> <sup>b</sup>	30–60	kein Einfluss	[131]
<i>B. bifidum</i> <sup>c</sup>	40–75	Optimum bei 55°C bzw. 65°C je nach Isoform	[138]
<i>B. circulans</i> <sup>d</sup>	4–24	höhere Ausbeute bei 4°C im Vergleich zu 24°C	[18]
<i>B. circulans</i> <sup>d</sup>	4–40	geringer Einfluss	[20]
<i>B. circulans</i> <sup>d</sup>	4–60	Erhöhung der Temperatur begünstigt GOS-Synthese	[158]
<i>B. circulans</i> <sup>d</sup>	15–45	Optimum bei 35°C	[161]
<i>B. circulans</i> <sup>d</sup>	20–50	Erhöhung der Temperatur vermindert GOS-Ausbeute	[159]
<i>B. circulans</i> <sup>d</sup>	20–50	kein Einfluss	[162]
<i>B. circulans</i> <sup>d</sup>	30–50	Optimum bei 40°C	[163]
<i>B. circulans</i> <sup>d</sup>	40–60	Optimum bei 40°C	[151]
<i>K. lactis</i> <sup>e</sup>	4–40	höhere Ausbeute bei 40°C im Vergleich zu 4°C	[20]
<i>K. lactis</i> <sup>e</sup>	30–40	Erhöhung der Temperatur begünstigt GOS-Synthese	[143]
<i>K. lactis</i> <sup>e</sup>	40–50	Erhöhung der Temperatur begünstigt GOS-Synthese	[153]
<i>K. lactis</i> <sup>e</sup>	40–60	Optimum bei 40°C	[152]
<i>K. lactis</i> <sup>e</sup>	40–60	Optimum bei 40–50°C	[148]
<i>K. marxianus</i> <sup>e</sup>	20–60 <sup>a</sup>	Optimum bei 40°C	[154]
<i>K. marxianus</i> <sup>e</sup>	25–40 <sup>a</sup>	Optimum 30°C	[164]
<i>L. acidophilus</i> <sup>f</sup>	25–42	kein Einfluss auf Ausbeute oder Zusammensetzung	[68]
<i>L. bulgaricus</i> <sup>f</sup>	30–60	Optimum bei 50°C	[134]
<i>L. delbrueckii</i> <sup>f</sup>	30–50	Optimum bei 40°C	[156]
<i>L. lactis</i> <sup>f</sup>	30–60	Optimum bei 50°C	[134]
<i>L. paracasei</i> <sup>f</sup>	20–60 <sup>a</sup>	Optimum bei 30°C	[165]

**Tabelle 2-10** (Fortsetzung)

Enzymquelle	Temperatur-Bereich [°C]	Effekt auf relative GOS-Ausbeute	Ref.
<i>L. reuteri</i> <sup>f</sup>	17–37	kein Einfluss	[96]
<i>L. reuteri</i> <sup>f</sup>	30–50	Optimum bei 40°C	[156]
<i>P. canescens</i> <sup>g</sup>	45–65	kein Einfluss	[19]
<i>P. expansum</i> <sup>g</sup>	37–55	leichter Anstieg der GOS-Ausbeute	[157]
<i>P. simplicissimum</i> <sup>g</sup>	40–55	Optimum bei 50°C	[80]
<i>S. thermophilus</i> <sup>h</sup>	30–60	Optimum bei 50°C	[134]
<i>T. maritima</i> <sup>i</sup>	50–100 <sup>a</sup>	Optimum bei 90°C	[149]

<sup>a</sup> Effekt im untersuchten Bereich wurde nur zu einer definierten Zeit gemessen und dient daher nur als Approximation.

<sup>b</sup> *Aspergillus* sp. <sup>c</sup> *Bifidobacterium* sp. <sup>d</sup> *Bacillus* sp. <sup>e</sup> *Kluyveromyces* sp. <sup>f</sup> *Lactobacillus* sp. <sup>g</sup> *Penicillium* sp. <sup>h</sup> *Streptococcus* sp.

<sup>i</sup> *Thermotoga* sp.

Hinsichtlich des eingesetzten Enzym/Substrat-Verhältnisses herrscht allgemeiner Konsens, dass dieses lediglich die Reaktionsgeschwindigkeit, nicht aber die maximal mögliche GOS-Ausbeute beeinflusst [101, 148, 151, 152, 166-168]. Aufgrund dessen ist die Aussagekraft von Experimenten mit variabler Enzymmenge und nur einem Probenahmezeitpunkt (so z. B. in [154, 169]) haltlos. Ebenso verhält es sich mit Publikationen, bei denen die erste Probenahme offensichtlich zu spät erfolgt ist [170] bzw. das Probenahmeintervall nicht angepasst wurde [171] oder die Versuche zu früh beendet wurden [19, 170]. Bisweilen lässt sich jedoch bei Vorhandensein entsprechender Grafiken ein Trend ausmachen, der ebenfalls darauf hinweist, dass die Enzymkonzentration keinen Einfluss auf die maximale GOS-Ausbeute hat. Abweichungen von dieser Regel sind möglich [149], sollte das eingesetzte Enzympräparat inhibierende Substanzen enthalten [172] oder die Reaktionsbedingungen (pH, Temperatur) so gewählt sein, dass die Reaktion nicht mehr unter kinetisch kontrollierten Bedingungen abläuft (einsetzende Enzyminaktivierung) [173].

Neben den zuvor besprochenen Reaktionsparametern, hat auch die spezifische Zusammensetzung des Reaktionsmediums (z. B. die Zugabe einzelner Ionen) einen Einfluss auf die Enzymaktivität und damit auf die GOS-Synthese und -Ausbeute. Beispielsweise fanden Montilla et al. [174] für die  $\beta$ -Galactosidase aus *K. lactis* heraus, dass Kalium im Vergleich zu Natrium die hydrolytische Aktivität erhöht. Gleichzeitig war auch die GOS-Syntheserate erhöht (Maximum nach 3 h für Kalium- und 24 h für Natrium-Phosphatpuffer), allerdings war die Ausbeute im Kalium-Puffer deutlich niedriger (25,8 % gegenüber 33 %). Auf die GOS-Zusammensetzung hatte die Wahl des Puffers nur einen geringen Einfluss (61 % Disaccharide und 39 % Trisaccharide mit Kalium-Puffer, 55 % Disaccharide und 45 % Trisaccharide mit Natrium-Puffer). Außerdem wurde für Natrium, aber nicht für Kalium, ein starker synergistischer Effekt mit Magnesium (im Bereich 0,1–2 mmol/L) aufgezeigt, was zu einer sehr geringen GOS-Ausbeute von nur 4 % führte, wenn Magnesium im Reaktionsmedium gänzlich fehlte. Eine erhöhte Pufferkonzentration (1 mol/L) und folglich eine höhere Natriumkonzentration führte zu einem Anstieg der GOS-Ausbeute (39,5 %) und einem höheren Anteil an Trisacchariden (53 %). Die Bedeutung von Magnesium für die Transgalactosylierung wurde ebenfalls für eine *E. coli*-Lactase aufgezeigt, während Natrium und Kalium keinen Effekt zeigten [125]. Bei einem rekombinant

hergestellten Enzym aus *Thermotoga maritima* beeinflussten weder Magnesium noch Calcium die GOS-Synthese [149]. Dies zeigt erneut den großen Einfluss der Enzymquelle auf die Eigenschaften der  $\beta$ -Galactosidase.

Während der Einfluss einzelner Milch- bzw. Molkebestandteile verhältnismäßig wenig erforscht ist, ist die Verwendung von komplexen Medien wie Milch und Molke zur Synthese von GOS seit Mitte der 2000er Jahre von zunehmendem Interesse (siehe Abbildung A.7-3) und wird in Kapitel 2.3.3 näher erläutert.

#### 2.3.2.4 Einfluss von Glucose und Galactose

Trotz der allgemein anerkannten Inhibitorwirkung der Monosaccharide im Zuge von Enzymaktivitätsmessungen mit oNPG bzw. Lactose kann im Hinblick auf die GOS-Synthese nicht pauschal von einer hemmenden Wirkung ausgegangen werden (Tabelle 2-11). Beispielsweise zeigten Yin et al. [126] für  $\beta$ -Galactosidasen aus *A. oryzae*, *K. lactis* und *B. circulans*, dass Glucose den Lactoseumsatz nicht bzw. kaum verminderte, jedoch zur vermehrten Bildung glucosehaltiger GOS-Disaccharide wie Allolactose führte und demnach als Akzeptormolekül genutzt werden konnte. Somit wurde zwar das GOS-Strukturprofil verändert, die Ausbeute aber nicht wesentlich beeinflusst bzw. möglicherweise sogar erhöht (konkrete Zahlenwerte sind nicht gegeben). Ein ähnlicher Effekt wurde auch mit Galactose beobachtet, wenngleich der Lactoseumsatz stärker beeinträchtigt wurde, was bei *A. oryzae* in einer deutlichen Reduktion der GOS-Syntheseleistung resultierte. Die Ausbeuten mit *K. lactis* und *B. circulans* scheinen aber wiederum durch die Nutzung von Galactose als Akzeptormolekül und damit einer vermehrten Synthese verschiedener Galactobiosen nur wenig beeinflusst zu werden.

Zu anderen Ergebnissen hinsichtlich der Beeinträchtigung der *A. oryzae*-Lactase kamen Albayrak & Yang [132] sowie Neri et al. [146]. Trotz eines geringeren Inhibitor-zu-Substrat-Verhältnisses von 1:4 (1:2 bei Yin et al. [126]) wirkten beide Monomere inhibierend, sowohl auf die Lactoseumsatzgeschwindigkeit als auch auf die GOS-Ausbeute. Auch hatte das Vorhandensein von Glucose einen stärkeren Einfluss (Reduktion der Ausbeute um ca. 14 %) als das von Galactose (Reduktion der Ausbeute um ca. 8 %). Es sei darauf hingewiesen, dass mit der analytischen Methode in den genannten Publikationen die GOS-Disaccharide nicht erfasst werden konnten, was die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen erklären könnte.

Demgegenüber konnte auch mit einer Lactase aus *B. bifidum* ein positiver Effekt von Glucose und Galactose auf die GOS-Ausbeute nachgewiesen werden (Tabelle 2-11). Ähnlich zu Yin et al. [126] berichteten Chockchaisawasdee et al. [175] zwar von einem verringerten Lactoseumsatz, jedoch keiner Beeinflussung der GOS-Ausbeute durch Glucose und nur einer geringen Inhibierung durch Galactose bei Verwendung einer  $\beta$ -Galactosidase aus *K. lactis*. Hingegen wurde die um ca. 50 % höhere GOS-Ausbeute mit *B. circulans* im kontinuierlichen Membranreaktor verglichen zum Batch-Prozess von den Autoren auf den deutlich niedrigeren Gehalt an Monosacchariden und deren inhibierenden Wirkung zurückgeführt [18]. Auch Valero [147] zeigte für die  $\beta$ -Galactosidasen aus *B. circulans* und *K. lactis*, dass bereits geringe Mengen an Galactose (25 g/L bei 400 g/L ILC) die GOS-Ausbeute negativ beeinflussen, wobei der Effekt nur marginal war und GOS-Disaccharide nicht erfasst werden konnten. Das Vorhandensein von Glucose wirkte sich auch negativ auf die GOS-Synthese ( $DP \geq 3$ ) mit *S. elviae* aus, wobei sich die Ausbeute teilweise um mehr als 50 % reduzierte (Tabelle 2-11). Dagegen führte eine Synthese mit lebenden Zellen zur Reduzierung der freien Glucose

(ca. 10 g/L im Vergleich zu ca. 60 g/L) und damit zu einer Steigerung der GOS-Ausbeute von 37,5 % auf 58 % [136]. Ähnliches wurde auch für *R. minuta* gezeigt [142].

**Tabelle 2-11:** Einfluss der initialen Zugabe von Glucose und Galactose auf die GOS-Ausbeute inklusive (DP  $\geq$  2) bzw. exklusive (DP  $\geq$  3) Disaccharid-GOS in Abhängigkeit von der verwendeten Enzymquelle.

Enzymquelle	Inhibitor	Inhibitor [g/L] / Lactose [g/L]	GOS-Def.	Einfluss auf GOS-Ausbeute	Ref.
<i>A. oryzae</i> <sup>a</sup>	Glucose	110 / 250	DP $\geq$ 2	kaum bis kein Einfluss	[126]
		100 / 400	DP $\geq$ 3	Reduktion um 14 %	[132]
<i>A. oryzae</i> <sup>a</sup>	Galactose	110 / 250	DP $\geq$ 2	Reduktion der Ausbeute	[126]
		100 / 400	DP $\geq$ 3	Reduktion um 8 %	[132]
<i>K. lactis</i> <sup>b</sup>	Glucose	110 / 250	DP $\geq$ 2	kaum bis kein Einfluss	[126]
		110 / 220	DP $\geq$ 2	Anstieg um 4 %	[175]
<i>K. lactis</i> <sup>b</sup>	Galactose	110 / 250	DP $\geq$ 2	kaum bis kein Einfluss	[126]
		110 / 220	DP $\geq$ 2	Reduktion um 6 %	[175]
		25–100 / 400	DP $\geq$ 3	Reduktion um 3–16 %	[147]
<i>B. bifidum</i> <sup>c</sup>	Glucose	100–150 / 400	DP $\geq$ 3	Anstieg um 13–22 %	[133]
<i>B. bifidum</i> <sup>c</sup>	Galactose	100 / 400	DP $\geq$ 3	Anstieg um 12 %	[133]
<i>B. circulans</i> <sup>d</sup>	Glucose	250 / 430	DP $\geq$ 2	kaum bis kein Einfluss	[126]
<i>B. circulans</i> <sup>d</sup>	Galactose	250 / 430	DP $\geq$ 2	kaum bis kein Einfluss	[126]
		25–100 / 400	DP $\geq$ 3	Reduktion um 8–20 %	[147]
<i>S. elviae</i> <sup>e</sup>	Glucose	20–90 / 360	DP $\geq$ 3	Reduktion um 27–64 %	[136]
<i>R. minuta</i> <sup>f</sup>	Glucose	25–200 / 200	DP $\geq$ 3	Reduktion um 30–89 %	[142]

<sup>a</sup> *Aspergillus* sp. <sup>b</sup> *Kluyveromyces* sp. <sup>c</sup> *Bifidobacterium* sp. <sup>d</sup> *Bacillus* sp. <sup>e</sup> *Sterigmatomyces* sp. <sup>f</sup> *Rhodotorula* sp.

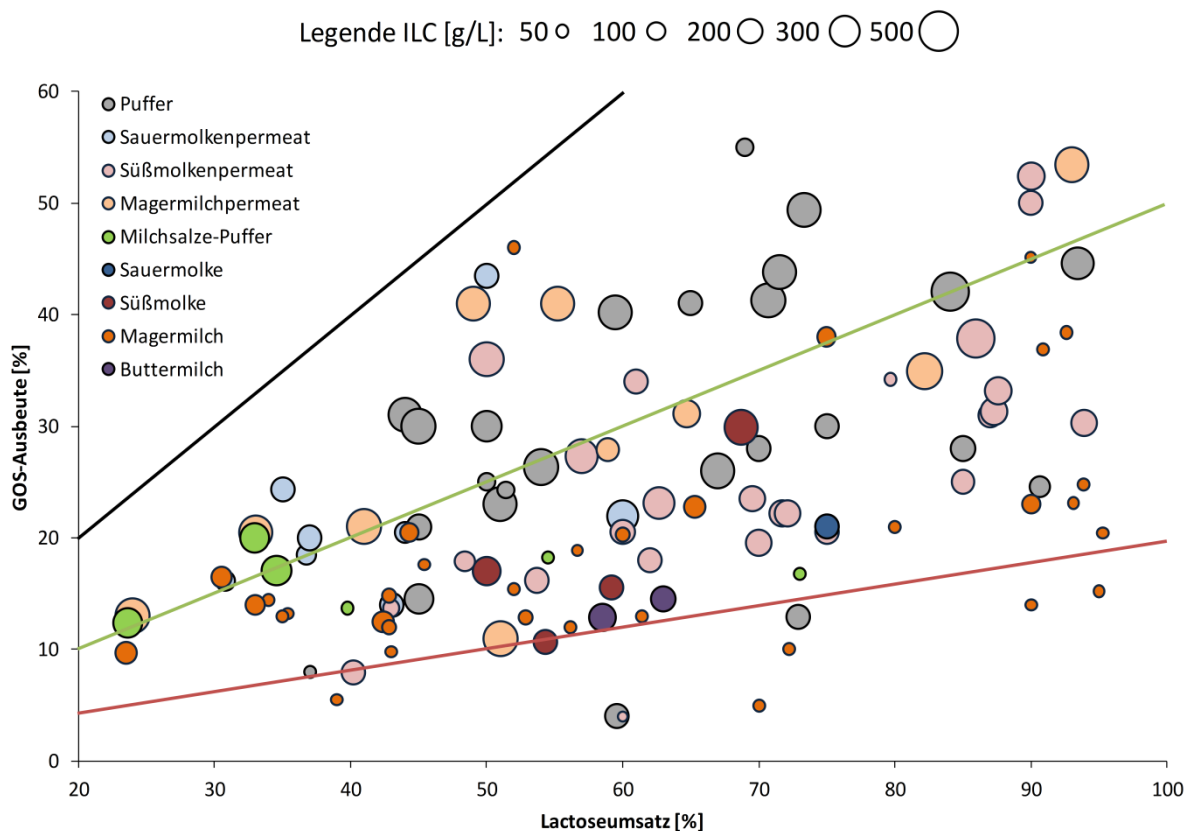
Ebenfalls sei darauf hingewiesen, dass Experimente, welche die Inhibitorwirkung von Glucose bzw. Galactose auf die GOS-Synthese untersuchen, eine deutlich höhere Monosaccharidkonzentration verwenden, als unter „normalen“ Reaktionsbedingungen erhalten werden würde. Demnach kann man davon ausgehen, dass die (potenziell) inhibierende Wirkung unter realen Synthesebedingungen deutlich niedriger ausfällt und ggf. vernachlässigbar ist. Vor allem ist bei einem Vergleich verschiedener Publikationen darauf zu achten, ob GOS-Disaccharide in die Gesamtausbeute mit einbezogen werden oder nicht.

### 2.3.3 GOS-Synthese in Milch und Molke

Die Änderung des Reaktionsmediums von einem optimal ausgewählten Puffersystem hin zu komplexen Substraten wie Milch und Molke, kann gänzlich andere GOS-Ausbeuten zur Folge haben. Zum Beispiel wurde von derselben Autorengruppe für eine  $\beta$ -Galactosidase aus *K. lactis* gezeigt, dass in Puffer (0,1 mol/L Na-Phosphat) eine maximale GOS-Ausbeute von 43,8 % [176], in konzentrierter Süßmolke jedoch nur eine maximale GOS-Ausbeute von 29,9 % [143] (jeweils 400 g/L ILC) möglich ist.



Ebenso verringerte sich die GOS-Ausbeute mit *Bullera singularis* in konzentriertem Süßmolkenpermeat im Vergleich zum Puffersystem (anzunehmen: 50 mmol/L Na-Phosphat) deutlich (34 % vs. 41 % bei jeweils 200 g/L ILC, [177]). Auch hinsichtlich des GOS-Abbaus wurden unterschiedliche Beobachtungen gemacht: Während das *B. circulans*-Enzym in Milch die gebildeten GOS nach ausreichend langer Zeit wieder vollständig abbaut [3], konnten Yin et al. [126] (unter Einsatz hoher Enzymmengen) in Na-Phosphat-Puffer zeigen, dass viele der vom Enzym synthetisierten Di- und Trisaccharide auch nach langer Reaktionszeit und nach wie vor vorhandener Enzymaktivität nicht abgebaut werden. Während ein Vergleich zwischen verschiedenen Autorengruppen grundsätzlich durch andere Reaktionsbedingungen (pH, Temperatur, freies oder immobilisiertes Enzym), Prozessführung (batch oder kontinuierlich), analytische Methoden oder auch GOS-Definition (mit oder ohne Einbeziehung der GOS-Disaccharide in die Gesamtausbeute) schwierig ist, so ist in Bezug auf die Substrate Milch und Molke oft auch der Vergleich innerhalb einer Publikation erschwert, da Pufferlösungen oft mit hohen Lactosekonzentrationen (z. B. ILC 100–200 g/L) angesetzt werden, Milch bzw. Molke aber unbehandelt (ILC < 50 g/L) verwendet werden (z. B. Rodriguez-Colinas et al. [178]).



**Abbildung 2-4:** GOS-Ausbeute in Abhängigkeit vom Lactoseumsatz zum Zeitpunkt der maximalen Ausbeute in verschiedenen Substraten der Molkereiindustrie und Puffern (vgl. auch Tabelle A.7-3). Die Blasenfläche ist proportional zur anfänglichen Lactosekonzentration (ILC). Die Linien dienen als Maß für die Transgalactosylierungsaffinität (prozentualer Anteil der umgesetzten Lactose zum Zielprodukt GOS, schwarz = 100 % (theoretisches Optimum), grün = 50 %, rot = 20 %). Modifizierte Version publiziert als Fig. 1 in [CF4].

Tabelle A.7-3 sowie Abbildung 2-4 geben einen Überblick über die GOS-Ausbeute in verschiedenen Medien der Molkereiindustrie. Diese wurden in die sieben Kategorien Sauermolkenpermeat, Sauermolke, Süßmolkenpermeat, Süßmolke, Buttermilch, Magermilchpermeat und Magermilch eingeteilt.

Ebenso sind ein synthetisch hergestellter Milchsälsalze-Puffer und andere Puffer (sofern in der entsprechenden Veröffentlichung mindestens eines der zuerst genannten Substrate verwendet wurde) aufgeführt. Während für Sauermolke (und auch Sauermolkenpermeat) nur sehr wenige Daten vorliegen, gibt es deutlich mehr Untersuchungen mit Süßmolke und Süßmolkenpermeat, aber auch mit Milch bzw. Milchpermeat. Da die anfängliche Lactosekonzentration ein wichtiger Faktor im Hinblick auf die GOS-Ausbeute ist, wurden die meisten Experimente mit konzentrierter oder Lactose-supplementierter Milch bzw. Molke durchgeführt.

Grundsätzlich kann man schlussfolgern, dass eine klare Unterscheidung zwischen Puffer und Molke-reisubstraten nicht möglich ist (Abbildung 2-4). Folglich können auch Synthesen in Milch oder Molke hohe GOS-Ausbeuten generieren. Tendenziell scheint jedoch Sauer- bzw. Süßmolke (auch bei verwendeten Lactosekonzentrationen von bis zu 400 g/L) die GOS-Ausbeute eher zu vermindern. Die mit ca. 30 % höchste Ausbeute im Medium Süßmolke (konzentriert auf 400 g/L Lactose) wurde mit einem Enzym aus *K. lactis* erzielt [143]. In unbehandelter Süß- und Sauermolke (ILC < 50 g/L) sind die beschriebenen Ausbeuten jedoch sehr gering (6,7 % mit *K. lactis* [170] und 1,5 % mit *A. niger* [179]). Untersuchungen mit Milch wurden vorrangig unbehandelt, d. h. bei niedrigen Lactosekonzentrationen durchgeführt. Die Transgalactosylierungsaktivität in diesem Medium scheint generell weniger ausgeprägt, ebenso variieren sowohl die GOS-Ausbeute als auch der Lactoseumsatz stark, was auf unterschiedliche Enzymquellen zurückgeführt werden kann. Nichtsdestotrotz wurden auch Ausbeuten von 46 % (mit *B. circulans*) bei nur 54 g/L Lactose erreicht [158].

Aufgrund ihrer kommerziellen Verfügbarkeit werden häufig  $\beta$ -Galactosidasen aus *A. oryzae*, *K. lactis* und *B. circulans* für die GOS-Synthese in Molkereisubstraten eingesetzt (siehe Abbildung A.7-4). Während der Einfluss des Reaktionsmediums bei *A. oryzae* weniger deutlich ist, lässt sich bei *K. lactis* für konzentrierte Süßmolke und konzentriertes Süßmolkenpermeat (ILC ca. 200 g/L) tendenziell ein positiver Einfluss der Molke-Inhaltsstoffe auf die Transgalactosylierung erkennen. Mit *B. circulans* wurden relativ viele Synthesen in Milch durchgeführt, die sich jedoch zum Teil stark in ihren Ergebnissen unterscheiden. Die Ursache hierfür liegt in unterschiedlichen Reaktionsbedingungen. Beispielsweise konnte bei 60°C eine GOS-Ausbeute von 46 % (ohne Einbeziehung der GOS-Dissaccharide) erreicht werden [158], während bei 40°C nur 15 % GOS (inklusive GOS-Dissaccharide) gebildet wurden [178]. Die höhere Reaktionstemperatur führte zur Inaktivierung von zwei der drei Isoformen im verwendeten Enzympräparat (Biolacta FN5), sodass folglich die Isoform mit der höchsten Transgalactosylierungsaktivität die Reaktion dominierte. Diese These wurde mittels Versuchen, in denen das Enzympräparat thermisch vorbehandelt wurde, gestützt [158]. Im Unterschied dazu bestimmten Sen et al. [161] für dasselbe Enzympräparat eine optimale Reaktionstemperatur von 35°C. Die maximal untersuchte Temperatur lag jedoch bei 45°C, also möglicherweise zu niedrig, um eine der Isoformen zu inaktivieren.

Im Unterschied zu Puffer konnte für die Substrate der Molkereiindustrie für die meisten Enzymquellen keine eindeutige Abhängigkeit der GOS-Ausbeute von der anfänglichen Lactosekonzentration gefunden werden (siehe Abbildung A.7-6). Einzig für *A. oryzae* kann eine gute Korrelation erhalten werden (siehe Abbildung A.7-5). Einen Unterschied zu den Puffersystemen scheint es nicht zu geben, was darauf hindeutet, dass weder Milchproteine noch Milchsälsalze dieses Enzym wesentlich in seiner Transgalactosylierungsaktivität beeinflussen.

Auch im Hinblick auf die GOS-Zusammensetzung spielt die Wahl des Substrates eine Rolle. Für *B. circulans* wurde beispielsweise gezeigt, dass in konzentriertem Molkenpermeat mit 400 g/L Lactose keine Hexa- und weniger Pentasaccharide im Vergleich zum Puffersystem gebildet werden (genaue Zusammensetzung nicht genannt) [147]. Ähnliches berichteten Rodriguez-Colinas et al. [173], allerdings könnte die Abwesenheit einiger GOS-Strukturen in Milch (46 g/L Lactose) auch auf die sich stark unterscheidenden Anfangslactosekonzentrationen (400 g/L ILC in Puffer) zurückzuführen sein.

Auch für eine *B. singularis*-Lactase ergaben sich Unterschiede hinsichtlich der GOS-Zusammensetzung in gepufferter Lactoselösung bzw. konzentriertem Süßmolkenpermeat, wobei die Bildung von Tetra- und Pentasacchariden in erstgenanntem bevorzugt wurde (Tabelle 2-12). Ebenso verhielt es sich mit einer Lactase aus *L. reuteri*, wobei die Konzentration von Allolactose und 6'-Galactosyllactose in Molkenpermeat um jeweils ca. 30 % reduziert war, während sich die Konzentration der anderen Hauptprodukte (3'- und 6'-Galactobiose sowie 3'-Galactosyllactose) nicht veränderte [96]. Ähnliche Beobachtungen wurden mit *L. bulgaricus* und *S. thermophilus* im Substrat Milch gemacht, in welchem nur die Bildung von Di- und Trisacchariden, nicht aber die Synthese von Tetrasacchariden nachgewiesen werden konnte (Tabelle 2-12). Demgegenüber wirkte sich bei *A. oryzae* die Verwendung von konzentrierter Sauermolke gegenüber Puffer positiv auf die Bildung längererkettiger GOS aus [180]. Für *L. lactis* hingegen scheint die Wahl des Substrates nur einen marginalen Einfluss auf die GOS-Zusammensetzung zu haben (Tabelle 2-12). In Summe kommen jedoch unabhängig von der verwendeten Enzymquelle die meisten Studien zu dem Schluss, dass bei Nutzung von Substraten aus der Molkereiindustrie der Anteil längererkettiger GOS (DP4-DP6) verringert ist.

**Tabelle 2-12:** Einfluss des Reaktionsmediums auf die GOS-Zusammensetzung, n. d. = nicht detektiert.

Enzymquelle	Medium	ILC [g/L] <sup>a</sup>	Anteil an Gesamt-GOS [%] <sup>b</sup>				Ref.
			DP2	DP3	DP4	DP5	
<i>Aspergillus oryzae</i>	Acetat-Puffer	400	- <sup>c</sup>	60	40	n. d.	[180]
	konz. Sauermolke	200	- <sup>c</sup>	42	42	15	
<i>Bullera singularis</i>	Na-Phosphat-Puffer	200	- <sup>c</sup>	44	37	20	[177]
	konz. Süßmolkenpermeat	200	- <sup>c</sup>	65	24	12	
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Milchsalze-Puffer	50	43	45	12	n. d.	[134]
	Magermilch	50	77	23	n. d.	n. d.	
<i>Lactobacillus lactis</i>	Milchsalze-Puffer	50	58	34	8	n. d.	[134]
	Magermilch	50	55	37	8	n. d.	
<i>Lactobacillus reuteri</i>	Na-Phosphat-Puffer	205	41	43	16	n. d.	[96]
	konz. Molkenpermeat	194	54	37	9	n. d.	
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Milchsalze-Puffer	50	53	33	14	n. d.	[134]
	Magermilch	50	62	38	n. d.	n. d.	

<sup>a</sup> ILC = anfängliche Lactosekonzentration (engl. *initial lactose concentration*). <sup>b</sup> DP = Polymerisationsgrad. <sup>c</sup> nicht angegeben, obwohl die analytische Methode eine Unterscheidung von Lactose und DP2-GOS zugelassen hätte, somit entweder nicht synthetisiert oder nicht als GOS aufgefasst.

### 2.3.4 GOS-Synthese mit *Lactobacillus* sp.

Eine Übersicht der mit verschiedenen *Lactobacillus*-Stämmen erhaltenen GOS-Ausbeuten in Abhängigkeit vom eingesetzten Substrat (Puffer, Milch, Molke) zeigt Tabelle A.7-4. Vorrangig wurden die Stämme *L. bulgaricus* ATCC 11842 und *L. reuteri* L103 untersucht. Die maximale Ausbeute mit knapp 50 % (Di- und Trisaccharide) bei 90 % Lactoseumsatz wurde mit einem rekombinant hergestellten Enzym aus *L. bulgaricus* bei 205 g/L Anfangslactose in Puffer erzielt [72]. Auch in Milch (50 g/L Lactose) konnten mit diesem Enzym moderate Ausbeuten von ca. 10 % erreicht werden. Eine weitere Erhöhung der Lactosekonzentration auf 150 g/L (ca. 30 % TM) führte jedoch nur zu einer marginal höheren GOS-Ausbeute von 12,5 % [134]. In konzentrierter Süßmolke mit ca. 18 % TM (ILC demnach ca. 150 g/L) wurde dagegen eine deutlich höhere GOS-Ausbeute von 42 % erhalten [181]. Dies ist ebenfalls erheblich mehr als in Milchsäure-Puffer mit ähnlicher Lactosekonzentration (125 g/L ILC, 16 % Ausbeute [134]). Dies lässt vermuten, dass hohe Salzkonzentrationen die Transgalactosylierungsaktivität dieses Enzyms positiv beeinflussen.

Die GOS-Synthese mit *L. reuteri* L103 wurde größtenteils in Puffer bei verschiedenen Temperaturen (17–37°C) und Lactosekonzentrationen (46–205 g/L) untersucht [96, 129, 182]. Beide Parameter wirkten sich grundsätzlich positiv auf die GOS-Ausbeute (DP2–4) aus (Maximum ca. 38 % bei 205 g/L Lactose, 30°C, pH 6,5 [182]). In konzentriertem Süßmolkenpermeat (194 g/L ILC, 23,5 % TM) war die Ausbeute gegenüber Puffer nur leicht vermindert (28 % vs. 25 % bei 17°C, [96]).

Sofern untersucht, hatte die Reaktionstemperatur generell keinen bzw. kaum Einfluss auf die Ausbeute (25–42°C für *L. acidophilus* [68], 30–50°C für *L. bulgaricus* [72], 25–37°C für *L. reuteri* [182], 20–40°C für *L. paracasei*, ab 40°C jedoch geringere Ausbeute aufgrund von Enzyminaktivierung [165]) oder GOS-Zusammensetzung [182]. Gleiches gilt für den pH-Wert (pH 6,0–8,0 für *L. plantarum* [183], pH 6,0 und 6,5 für *L. reuteri* [182]) sowie die Pufferkonzentration (50 mmol/L und 200 mmol/L für *L. reuteri* [182]). Letztere wirkte sich jedoch negativ auf die Reaktionsgeschwindigkeit aus.

### 2.3.5 GOS-Synthese mit *Cryptococcus laurentii*

Obgleich *Cryptococcus laurentii* zur Herstellung des GOS-Produktes CUP-Oligo (Nissin Sugar Manufacturing Co. Ltd.) eingesetzt wird und demnach kommerziell nutzbare Transgalactosylierungseigenschaften aufweist, existieren nur wenige Publikationen von den Erfindern [65, 184, 185]. Weiteres wissenschaftliches Interesse an dieser Enzymquelle blieb jedoch aus, trotz interessanter Eigenschaften wie optimaler Aktivität und hoher Stabilität im sauren Milieu (pH 4,3), der Möglichkeit des Einsatzes relativ hoher Temperaturen (50–55°C) bei der Synthese und – vor allem in Hinblick auf die Anwendung in Milch oder Molke interessant – keinem bzw. geringem Einfluss mono- ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) und divalenter ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) Kationen [65]. Neben der Synthese von Di-, Tri- und Tetrasacchariden ist das Hauptprodukt dieses Enzyms das Trisaccharid 4'-Galactosyllactose (4'-GL, Ausbeute ca. 28 % bei 25 g/L ILC) [65]. Dessen Synthese während der Anzucht von *C. laurentii* OKN-4 wurde durch Festlegung geeigneter Fermentationsbedingungen optimiert [184]. Ebenso wurde der Einsatz von in Calciumalginat immobilisierten Zellen untersucht [185]. Die Ausbeute an 4'-GL lag mit 17,7 % bei 100 g/L ILC jedoch deutlich unterhalb derer, die mit lebenden Zellen (31 % Ausbeute bei 100 g/L ILC) erzielt wurde [184].

### 2.3.6 GOS-Synthese mit mehreren $\beta$ -Galactosidasen

Die Kombination mehrerer  $\beta$ -Galactosidasen zur Erhöhung der GOS-Ausbeute wurde bisher verhältnismäßig wenig untersucht. Das kommerziell erhältliche Produkt Oligomate 55 von Yakult Pharmaceutical Industry Co., Ltd wird mittels zwei Enzymen aus *Bullera singularis* und *Kluyveromyces lactis* hergestellt, wobei ersteres zum GOS-Aufbau und letzteres vor allem zur Spaltung der verbleibenden Lactose genutzt wird. Damit lässt sich eine GOS-Ausbeute von ca. 56 % mit ca. 13 % Restlactose erhalten [186]. Es ist jedoch nicht bekannt, ob auch das *K. lactis*-Enzym zum GOS-Aufbau beiträgt.

In einer Patentschrift von Vitalus Nutrition Inc. [187] wird die sequentielle Kombination der  $\beta$ -Galactosidasen aus *A. oryzae* und *K. lactis* beschrieben. Dadurch konnte die Ausbeute von ca. 32 % auf 41 % erhöht werden. Dies war vor allem auf die Bildung neuer GOS-Disaccharide zurückzuführen, der Anteil an Tri- und längerkettigen GOS änderte sich kaum. Ebenso wurde der Restlactosegehalt deutlich reduziert. Ähnliche Ergebnisse erzielten auch Santibáñez et al. [188], welche die zuvor genannten Enzyme vorrangig kombinierten, um ein lactosearmes GOS-Produkt zu erzeugen, was eine nachgeschaltete Aufreinigung (Abtrennung der Monosaccharide) erleichtern würde. Auf diese Weise gelang es ihnen, den Lactosegehalt um etwa 70 % zu reduzieren (Restlactose ca. 8,7 %), bei gleichzeitiger Steigerung der GOS-Ausbeute um ca. 30 % (von 36,8 % auf 47,4 %). Grund hierfür war vor allem die vermehrte Synthese der Disaccharide 6'-Galactobiose und Allolactose.

Der parallele Einsatz von aus *A. oryzae* und *K. fragilis* erhaltenen Lactasen führte hingegen zu einer geringeren GOS-Ausbeute im Vergleich zur alleinigen Synthese mit *K. fragilis* (37 % vs. 27 %), was einer verminderten Bildung von Tri- und Tetrasacchariden zuzuschreiben ist. Der GOS-Disaccharidanteil blieb nahezu unverändert [189]. Die sequentielle Kombination von *A. oryzae* und *B. circulans* führte zwar zu einer weiteren Ausbeutesteigerung (von ca. 26 % auf 34 %, DP3-DP6), blieb jedoch unterhalb derer, die mit *B. circulans* allein erzielt wurde (ca. 40 %) [147]. Eine parallele bzw. sequenzielle (ohne die Inaktivierung des ersten Enzyms) Kopplung von Enzymen aus *B. circulans* und *A. oryzae* bzw. *K. lactis* konnte die GOS-Ausbeute (gemessen an den zwei Haupt-Trisacchariden) ebenfalls nicht steigern [151].

### 2.3.7 Möglichkeiten der Glucose-Entfernung

Gemäß des Synthesewegs enthält das Endprodukt neben den Zielkomponenten (GOS) stets nicht umgesetzte Lactose sowie die Monosaccharide Glucose und Galactose [190]. Da diese „unerwünschten“ Zucker nur zum energetischen, nicht aber zum prebiotischen Wert beitragen, limitiert dies den Einsatz von GOS in Diabetikernahrung bzw. lactosearmen Lebensmitteln [191]. Es gibt daher einige Bestrebungen, das Zuckergemisch nach der Synthese aufzureinigen, d. h. Glucose, Galactose und/oder Lactose zu entfernen bzw. abzureichern. Untersuchte Verfahren beinhalten Größenausschlusschromatographie, Filtration, Aktivkohlebehandlung oder Hefefermentation [191]. Bei letzterer ist es bei Auswahl einer geeigneten Hefe ebenfalls möglich, neben den Monosacchariden zugleich Lactose zu entfernen. Beispielsweise konnte durch eine anschließende *K. lactis*-Fermentation die Reinheit von 28,7 % auf 97,5 % (DP3–5) gesteigert werden, jedoch wurden auch einige GOS-Trisaccharide verstoffwechselt, sodass die Gesamtausbeute um ca. 20 % vermindert wurde (von 28,7 % auf 23,0 %) [157].

Alternativ kann die Glucose-Entfernung auch während der GOS-Synthese erfolgen, was sich zudem positiv in der GOS-Ausbeute niederschlagen kann. Beispielsweise führte der parallele Glucose-Umsatz durch eine Bäckerhefe bei einer  $\beta$ -Galactosidase aus *C. laurentii* zur vermehrten Bildung von 4'-Galactosyllactose [185]. Die Verwendung lebender Zellen von *S. elviae* und *S. magnum* senkte den Gehalt freier Glucose im Synthesemedium deutlich und führte somit zu einer verbesserten GOS-Ausbeute [136, 142]. Ebenso kann die Umwandlung enzymatisch mit Glucose-Oxidase erfolgen. Hierbei wird Glucose zu  $\delta$ -Gluconolacton oxidiert, welches in Wasser spontan zu Gluconsäure reagiert. Das Nebenprodukt Wasserstoffperoxid wird mit Hilfe von Katalase in Wasser und Sauerstoff umgesetzt [192]. Der Einsatz dieses Enzymsystems während der GOS-Synthese wurde erstmals von Onishi et al. [104] beschrieben, welche die Ausbeute um den Faktor 1,7 (von 136 g/L auf 234 g/L) erheblich steigern konnten ( $\beta$ -Galactosidase von *S. magnum*, 360 g/L Lactose). Trotz der beachtlichen Ergebnisse, gab es in den folgenden Jahren nur eine weitere Publikation zu diesem Thema, wobei sich die parallele Glucose-Oxidation bei *B. circulans* negativ auf die GOS-Ausbeute auswirkte [193]. Kürzlich erschienen zwei weitere Veröffentlichungen zu dieser Thematik [194, 195], welche beide eine  $\beta$ -Galactosidase aus *K. lactis* verwendeten, allerdings keinen Einfluss auf die GOS-Ausbeute feststellten. Im Unterschied zu den beiden erstgenannten, fanden sich jedoch weiterhin beachtliche Mengen an Glucose in der Reaktionslösung.

### 2.3.8 Kommerziell erhältliche GOS-Produkte

Tabelle 2-13 gibt einen Überblick über GOS-Produkte verschiedener Hersteller und die Zusammensetzung der einzelnen Zuckerfraktionen. Eine ausführliche Darstellung (Firmennamen, GOS-Zusammensetzung, etc.) findet sich im Anhang (Tabelle A.7-5).

Für die meisten GOS-Produkte wird eine  $\beta$ -Galactosidase aus *B. circulans* eingesetzt, wodurch der Anteil an Glucose, Galactose und Lactose ähnlich ist und jeweils ca. 20 %, 1 % und 20 % beträgt, wonach sich ein GOS-Gehalt von etwa 60 % ergibt (Vivinal®, BIOLIGO®, King-Prebiotics Sirup, Nature's GOS, Goat OLIGO). Im Gegensatz dazu werden einige Produkte durch Filtration (VITAGOS™, Nestlé GOS Pulver) oder Fermentation mit *K. lactis* (King-Prebiotics Pulver) oder *S. cerevisiae* (Mother's OLIGO) zusätzlich aufgereinigt, sodass der Monosaccharid- und Lactoseanteil entsprechend sinkt und Reinheiten von bis zu 99 % erzielt werden. Demgegenüber entschloss sich Ingredion Inc. ihr Produkt BIOLIGO® mit nur knapp 60 % GOS-Anteil zu verkaufen, wogegen das Vorgängerprodukt Purimune chromatographisch aufgereinigt wurde, um ca. 90 % Reinheit zu erhalten [196].

Ebenso wird häufig eine  $\beta$ -Galactosidase aus *A. oryzae* verwendet, mit der jedoch nur Reinheiten von knapp 40 % (Floraid [197]) erreicht werden. Durch partielle Aufreinigung (Nestlé GOS Pulver) oder die Kombination mit anderen Enzymen (*K. lactis* bei VITAGOS™ und Oligomate® 55) kann der GOS-Anteil auf 46 % bzw. 56–66 % gesteigert werden.

Das einzige Produkt, welches in Pulver- oder Kapselform direkt für den Endverbraucher vermarktet wird, ist Bimuno® von Clasado Inc., welches mit einem patentierten Enzym aus *B. bifidum* [198, 199] hergestellt wird. Im Unterschied zu allen anderen Produkten ist auch das  $\alpha(1\rightarrow6)$ -glykosidisch verknüpfte Disaccharid Galactobiose enthalten.

**Tabelle 2-13:** Zusammensetzung kommerziell erhältlicher GOS-Produkte sortiert nach Enzymquelle, k. A. = keine Angabe. Für Hersteller, GOS-Zusammensetzung und weitere Angaben siehe ausführliche Tabelle A.7-5.

Markenname	Enzymquelle	Zuckerkonz. [% TM] <sup>a</sup>				Verknüpfungen <sup>b</sup>	Ref.
		Glc	Gal	Lac	GOS		
Floraid™ GOS (Pulver)	<i>A. oryzae</i>	24,7	9,33	28,6	39	k. A.	[197]
Nestlé GOS Pulver <sup>c</sup>	<i>A. oryzae</i>	10	5	20-40	46	$\beta(1\rightarrow3)$ , $\beta(1\rightarrow4)$ , $\beta(1\rightarrow6)$	[200]
VITAGOS™ <sup>c</sup>	<i>A. oryzae</i> , <i>K. lactis</i>	16,8	2,5	15	65,6	$\beta(1\rightarrow3)$ , $\beta(1\rightarrow4)$ , $\beta(1\rightarrow6)$	[201, 202]
Bimuno® Sirup	<i>B. bifidum</i>	22	1,6	12,3	64,2	$\beta(1\rightarrow3)$ , $\beta(1\rightarrow6)$ , $\alpha(1\rightarrow6)$	[203, 204]
Vivinal® GOS	<i>B. circulans</i>	20,3	1,1	18,6	59,9	$\beta(1\rightarrow2)$ , $\beta(1\rightarrow3)$ , $\beta(1\rightarrow4)$ , $\beta(1\rightarrow6)$	[182]
Purimune™ Pulver <sup>c,d</sup>	<i>B. circulans</i>	0-1	0-0,5	7-10	90-92	$\beta(1\rightarrow3)$ , $\beta(1\rightarrow4)$ , $\beta(1\rightarrow6)$	[196, 205]
BIOLIGO® GL 5700 IMF Sirup	<i>B. circulans</i>	22	0,8	17,5	57	k. A.	[206]
King-Prebiotics GOS-1000-P (Pulver) <sup>c</sup>	<i>B. circulans</i>		1		99	$\beta(1\rightarrow4)$ , u. a. <sup>e</sup>	[207]
King-Prebiotics GOS-570-S (Sirup)	<i>B. circulans</i>	20,5	1,5	18	60	$\beta(1\rightarrow4)$ , u. a.	[208]
Nature's GOS	<i>B. circulans</i>	19	0,8	18	62	$\beta(1\rightarrow4)$ , u. a.	[209]
Mother's OLIGO <sup>c</sup>	<i>B. circulans</i>	1,9	3,5	17,5	77,2	$\beta(1\rightarrow4)$ , u. a.	[209]
Goat OLIGO	<i>B. circulans</i>	20	1,9	18,7	59,3	$\beta(1\rightarrow4)$ , u. a.	[209]
Oligomate® 55	<i>B. singularis</i> , <i>K. lactis</i>	22,4	8,6	12,7	56,4	$\beta(1\rightarrow2)$ , $\beta(1\rightarrow3)$ , $\beta(1\rightarrow4)$ , $\beta(1\rightarrow6)$	[186]
Cup-Oligo®	<i>C. laurentii</i>		25-30		70-75	$\beta(1\rightarrow4)$ , u. a.	[127, 210, 211]
Promovita® GOS	k. A.		k. A.		57-70	k. A.	[212]
Dairygold GOS	k. A.		k. A.		k. A.	k. A.	[213]

<sup>a</sup> Zuckerkonzentration bezogen auf die Trockenmasse, Glc = Glucose, Gal = Galactose, Lac = Lactose, GOS = Gesamt-GOS.

<sup>b</sup> nur neu synthetisierte Verknüpfungen, Fettdruck = die vorherrschende Verbindung. <sup>c</sup> teilweise Aufreinigung durch Filtration oder Hefefermentation (Details siehe Text bzw. Tabelle A.7-5). <sup>d</sup> Produkt durch BIOLIGO® ersetzt. <sup>e</sup> u. a. = und andere, da weitere Verknüpfungen nicht näher spezifiziert.

Zu bemerken ist weiterhin, dass fast alle Verfahren Lactose als Substrat verwenden. Da für die Herstellung des GOS-Pulvers von Nestlé jedoch teilentmineralisiertes, konzentriertes Süßmolkenpermeat (TM ca. 50 %) genutzt wird, enthält dieses Produkt in Spuren (ca. 0,2 %) auch 3'- und 6'-Sialyllactose [200]. Die größte Diversität hinsichtlich der vorhandenen glykosidischen Bindungen haben die Produkte Oligomate® 55 und Vivinal® GOS (Tabelle 2-13), wobei diese oft nicht näher spezifiziert werden und beispielsweise davon ausgegangen werden kann, dass alle mit *B. circulans* hergestellten GOS-

Produkte eine ähnliche Strukturdiversität aufweisen. Generell kann anhand der Herstellerangaben festgemacht werden, dass GOS aus *C. laurentii* und *B. circulans* vorrangig  $\beta(1\rightarrow4)$ -glykosidisch verknüpft sind, während bei GOS aus *B. bifidum*  $\beta(1\rightarrow3)$ - und  $\beta(1\rightarrow6)$ -glykosidische Bindungen dominieren und in *A. oryzae*-Produkten  $\beta(1\rightarrow4)$ - und  $\beta(1\rightarrow6)$ -Verknüpfungen den Großteil ausmachen. Der Anteil von GOS-Disacchariden an den Gesamt-GOS ist beim Produkt Bimuno® mit 41 % deutlich höher als in anderen Produkten (21–33 %, vgl. Tabelle A.7-5). Ein detaillierter Vergleich verschiedener GOS-Produkte hinsichtlich der enthaltenen Strukturen findet sich in [190].

### 2.3.9 Eigenschaften und Anwendung

Galactooligosaccharide sind gegenüber anderen Zuckern wie Saccharose oder Fructooligosacchariden (FOS) auch im stark sauren Milieu bei pH 2–3 sehr temperaturstabil [211, 214]. Beispielsweise ist nach 100-tägiger Lagerung bei 20°C bzw. 37°C und pH 3,0 kein GOS-Abbau zu verzeichnen, während dieser bei FOS und Saccharose bereits vollständig ist [211]. Ein Vergleich zwischen verschiedenen Produkten ist schwierig, da unterschiedliche Temperatur-Zeit-pH-Wert-Kombinationen angewendet wurden und nicht immer alle Parameter vollständig angegeben sind. Die Tabelle 2-14 gibt einen Überblick über einige Parameter-Kombinationen, bei denen kein GOS-Verlust beobachtet wurde. Produktspezifische Unterschiede können nicht ausgeschlossen werden, da zum Teil große Unterschiede hinsichtlich der generellen Temperaturstabilität gemacht werden (z. B. 110°C für Floraid™ [197], 140°C für Cup-Oligo® [211], 160°C für Oligomate® 55 [214]).

**Tabelle 2-14:** Temperaturstabilität verschiedener GOS-Produkte gemessen bei verschiedenen Temperatur-Zeit-pH-Wert-Kombinationen, bei denen keine Zersetzung beobachtet wurde, k. A. = keine Angabe.

Markenname	pH	T [°C]	t [min]	Ref.
Cup-Oligo®	3,0	120	k. A.	[211]
Vivinal® GOS	2,0	85	5	[215]
Promovita® GOS	3,6	121	120	[216]
Purimune™	4,0	100	60	[217]
Oligomate® 55	k.A.	160	10	[214]
Oligomate® 55	3,0	120	10	[214]
Oligomate® 55	2,0	100	10	[214]
Bimuno®	6,0	100	180	[218]
Bimuno®	5,0	80	180	[218]

Aufgrund dieser ausgeprägten Temperaturstabilität können GOS zu pasteurisierten Produkten [212], Bonbons [219] oder Teigen für Backwaren wie Brot [220] oder Keksen [221] gegeben werden. Auch Lebensmittel mit niedrigem pH-Wert wie Fruchtsäfte [218, 221, 222] oder Marmeladen sind geeignet sowie Milchprodukte wie Käse [223], Eis [224-226] und Joghurt [227]. Letzterer enthält naturgemäß aufgrund der  $\beta$ -Galactosidasen der Starterkultur geringe Mengen an GOS (0,3–0,9 g/kg [228] bzw. 2,2–2,5 g/kg [229]). Gleiches gilt für lactosefreie Produkte, bei denen  $\beta$ -Galactosidase zur



Lactosespaltung eingesetzt wird. Trotz der notwendigen hohen Hydrolysegrade von über 99 % und demnach bereits einsetzendem GOS-Abbau, fanden Ruiz-Matute et al. [230] Gehalte von 0,9–4,4 g/L (2,2–10,3 % des Gesamtzuckers) in kommerziell erhältlicher lactosefreier UHT-Milch. Vor allem zur Erhöhung des GOS-Gehalts in Joghurt gibt es einige Studien, bei denen  $\beta$ -Galactosidasen aus *A. oryzae* [231] bzw. *K. lactis* [232] oder probiotische Bifidobakterien-Stämme (z. B. *B. infantis*) [233] eingesetzt wurden. Bei letzterem gelang es, den GOS-Anteil von ca. 3 g/kg (entspricht 4,3 % des Gesamtzuckers) auf ca. 7 g/kg (entspricht 10,3 % des Gesamtzuckers) mehr als zu verdoppeln.

Die relative Süße (Saccharose = 100 %) von GOS variiert in Abhängigkeit von der konkreten Zusammensetzung bzw. der Gehalte an Glucose, Galactose und Lactose im Produkt und wird mit 40 % für Promovita® [216], 30–35 % für Purimune [217], 32 % für Oligomate® 55 [214] und 25 % für Cup-Oligo [211] angegeben. Beim Austausch von Saccharose durch GOS müssen daher unter Umständen weitere Rezepturanpassungen vorgenommen werden [224].

Das weitaus größte Einsatzgebiet für GOS ist mit einem Anteil von ca. 85 % (2011) die Säuglings- und Kleinkindnahrung [234]. Grund hierfür ist die strukturelle Ähnlichkeit zu den humanen Milcholigosacchariden (HMOS), welche für die prebiotische Wirkung der Muttermilch verantwortlich sind [235–237]. Da Muttermilchersatznahrung auf Kuhmilchbasis hergestellt wird, diese aber kaum Oligosaccharide enthält (ca. 0,05 g/L [238]), sollten aufgrund der hohen Konzentration in humaner Muttermilch (20–25 g/L im Kolostrum, 5–20 g/L in reifer Milch [239]) und folglich einer täglichen HMOS-Aufnahme von ca. 10 g [240] GOS supplementiert werden. Als empfohlene Maximalkonzentration in der rekonstituierten Säuglingsmilch wird von den Herstellern recht einheitlich 7,2 g/L [186, 201, 203, 205, 208] bzw. 7,8 g/L [200, 209] angegeben. Davon abweichend gibt es auch Empfehlungen von 8 g/L [215] bzw. 4 g/L [197]. Größere Unterschiede existieren bei der Dosierung für Kleinkindnahrung (0,65–3 g pro Portion) und anderen Lebensmitteln (0,86–11 g pro Portion). In Deutschland enthalten die Frühgeborenen- und Anfangsmilch von Humana GmbH 5 g/L GOS, für die Folgemilch ist der Gehalt nicht näher spezifiziert [241]. Die Anfangsnahrung von HiPP GmbH & Co. Vertrieb KG enthält 3 g/L GOS, die Folgemilch 4 g/L und die Kindermilch ab dem 1. bzw. 2. Lebensjahr 6 g/L [14]. Milupa Nutricia GmbH verwenden eine GOS:FOS-Mischung im Verhältnis 9:1 (entspricht in Frühgeborenen-, Anfangs- und Folgemilch 7,2 g/L GOS und 0,8 g/L FOS, in Kindermilch ab dem 1. Jahr 12,6 g/L GOS und 1,4 g/L FOS [242]), welche die in humaner Muttermilch vorkommende Verteilung von kurz- und langkettigen Oligosacchariden nachahmt [243]. Die Produkte von Nestlé Nutrition GmbH enthalten keine GOS, sondern die HMOS 2'-Fucosyllactose und Lacto-N-neotetraose (Marke BEBA® Supreme [244]).

In zahlreichen Studien wurde bestätigt, dass GOS eine ähnliche (prebiotische) Wirkung wie HMOS aufweisen und sich bei entsprechender Supplementation die Intestinalflora von Flaschen-Säuglingen denen von gestillten Säuglingen angleicht [245]. Bei reif- und frühgeborenen Säuglingen wurde durch Anreicherung der Säuglingsnahrung mit GOS/FOS eine Erhöhung der Bifidobakterien [243, 245–253] und Laktobazillen [245, 246, 249, 253], die vermehrte Bildung kurzkettiger Fettsäuren und folglich ein Absenken des pH-Wertes [245, 249, 251, 254], eine Reduktion pathogener Keime [246, 248, 252], eine weichere Stuhlkonsistenz [243, 246, 249, 253, 255] und eine höherer Stuhlfrequenz [245, 249, 253, 255] beobachtet. Die Tendenz zu weicherem Stuhl „ähnlich wie bei gestillten Babys“ wird von HiPP GmbH & Co. Vertrieb KG sogar auf der Verpackung ausgelobt [14]. Ebenso wurde mittels GOS/FOS-Supplementation das Auftreten von Atemwegsinfektionen [256–258], Fiebererkrankungen [257], Diarrhö [256, 257] und Verstopfung [257] vermindert. Der Nachweis von GOS/FOS im Stuhl

beweist die Wirkung als Ballaststoff [250]. Bei durch die Eltern genetisch vorbelasteten Säuglingen kam es zu einem verringerten Ausbruch von Neurodermitis [259].

Auch bei Erwachsenen konnten ähnliche Effekte nachgewiesen werden. So führte die Gabe von GOS zu einem Anstieg der Bifidobakterien- und Laktobazillen-Anzahl im Darm von gesunden [260, 261] bzw. adipösen [262] Studienteilnehmern, zu einer weicheren Stuhlkonsistenz [260] sowie zu einer verbesserten Calcium-Aufnahme bei postmenopausalen Frauen [263]. Auch konnten aufgrund des verbesserten Bifidobakterien-Wachstums die Symptome bei Patienten mit Reizdarmsyndrom gemindert werden [264]. Die bifidogene Wirkung ist zudem dosisabhängig [204, 260, 265] und einige Individuen zeigen trotz hoher Dosen von bis zu 10 g/d keine Veränderung hinsichtlich der Bifidobakterien-Anzahl [265]. Depeint et al. [204] verglichen den Effekt von Vivinal® GOS (vorrangig  $\beta(1\rightarrow4)$ - und  $\beta(1\rightarrow6)$ -Verknüpfungen) mit Bimuno® (vorrangig  $\beta(1\rightarrow3)$ -Verknüpfungen), wobei Bimuno® zu einem stärkeren Anstieg der Bifidobakterien-Population führte. Die Autoren vermuteten die Ursache dieses Effekts in der Tatsache, dass *B. bifidum* die vorherrschende Spezies innerhalb der Gattung der Bifidobakterien war und das Produkt Bimuno® mit einer  $\beta$ -Galactosidase derselben Spezies hergestellt wurde. Analog konnten Rabiou et al. [21] mit verschiedenen Bifidobakterien-Spezies zeigen, dass diese besonders gut auf den GOS wuchsen, die mit den eigenen Enzymen hergestellt wurden, was die genannte These stützt.

Neben dem Einsatz von GOS in der Humanernährung, sei auch auf Produkte im Bereich der Tiernahrung (z. B. Bitos™ von Clasado Inc., Nutrabiotic® GOS von Dairy Crest Ltd.) bzw. entsprechende Studien mit Kühen [266], Hühnern [267], Schweinen [268], Schafen [269], Fischen [270] oder Shrimps [271] verwiesen.

### 2.3.10 Modifizierte GOS-Strukturen und GOS-Alternativen

Oligosaccharide sind nach Lactose und Fett die drittgrößte Fraktion in der Trockenmasse humaner Muttermilch [237, 272]. HMOS sind aus fünf unterschiedlichen Monomeren – Glucose (Glc), Galactose (Gal), Fucose (Fuc), N-Acetylglucosamin (GlcNAc) und N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac, auch: Sialinsäure) – aufgebaut [239, 273]. Die Milch anderer Säugetiere enthält auch N-Acetylglactosamin (GalNAc) sowie die Sialinsäure N-Glycolylneuraminsäure (Neu5Gc) [274]. Das Grundgerüst besteht dabei aus Lactose am reduzierenden Ende. Die einfachsten Strukturen sind Trisaccharide, welche durch  $\alpha$ -glykosidische Anbindung von Fucose oder Sialinsäure entstehen (Abbildung 2-5). Tetra- und höhere Oligosaccharide entstehen durch die  $\beta(1\rightarrow3)$ - oder  $\beta(1\rightarrow6)$ -glykosidische Verknüpfung mit Lacto-N-biose (Gal- $\beta(1\rightarrow3)$ -GlcNAc) oder N-Acetyllactosamin (Gal- $\beta(1\rightarrow4)$ -GlcNAc, auch: LacNAc), an welche wiederum Fucose und/oder Sialinsäure gebunden sein kann [239]. Die Kettenlänge kann bis zu 14 Monomere betragen. Dadurch ergibt sich eine große Strukturvielfalt von über 200 Oligosacchariden, von welchen bisher ca. 130 identifiziert wurden [237]. Des Weiteren wurden kürzlich auch die in GOS-Mischungen vorkommenden Galactosyllactosen (GL) in humaner Kolostral- und auch reifer Milch nachgewiesen [275]. Die Konzentrationen waren je nach Individuum sehr unterschiedlich, generell war jedoch 6'-GL mit 3–700 mg/L (Median 81 mg/L, 41 Kolostralmilchproben) die vorherrschende Struktur, aber auch 3'-GL (0,5–39 mg/L) und 4'-GL (0,06–8 mg/L) wurden detektiert [275].

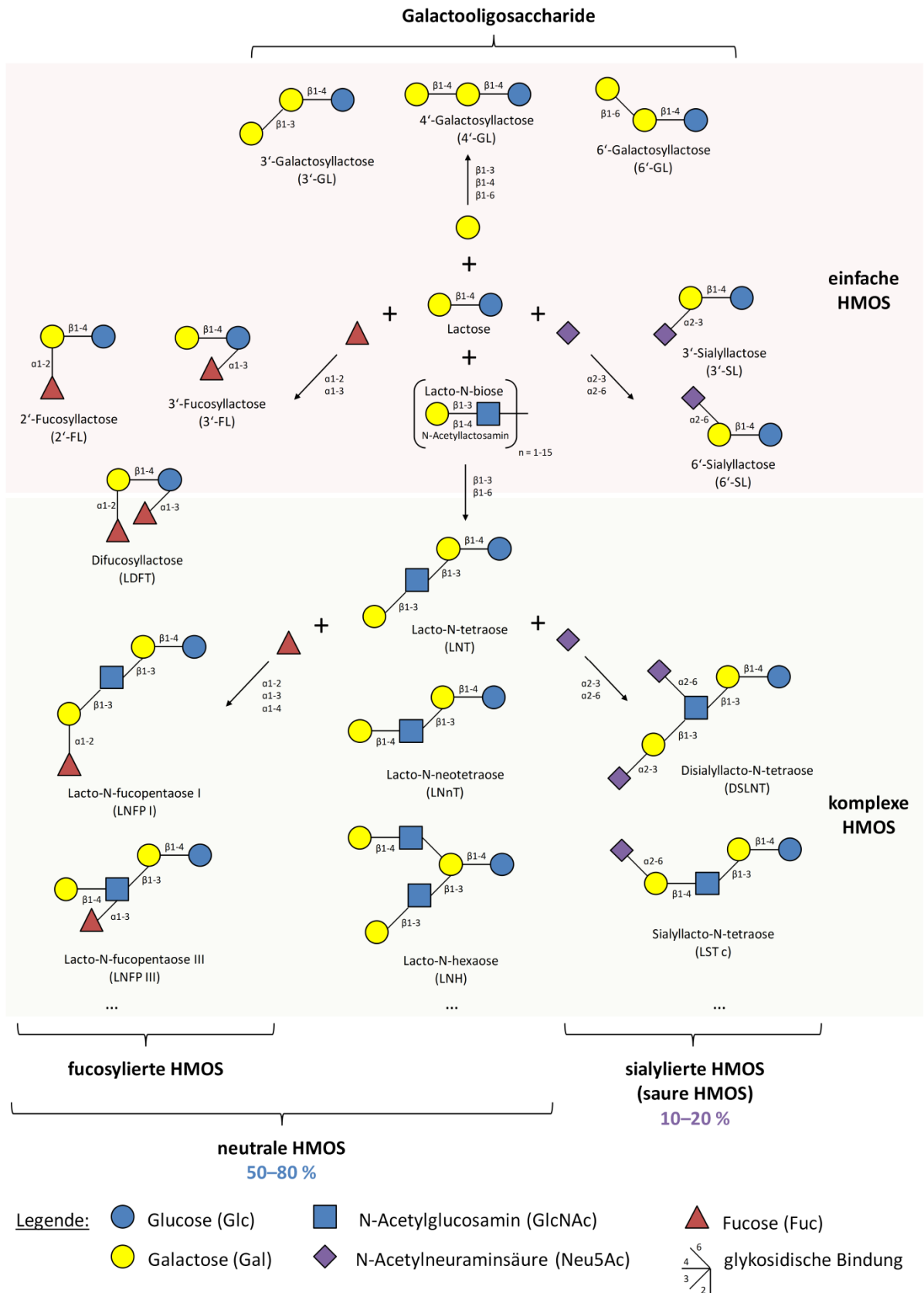


Abbildung 2-5: Strukturen (Beispiele) humaner Milcholigosaccharide (HMOs).

Wie bereits angedeutet, sind sowohl die Konzentration als auch die konkrete Zusammensetzung der HMOS starken individuellen Schwankungen unterworfen [275, 276] und hängen von einer Vielzahl von Parametern ab. Zu nennen sind geographische [277] und genetische Faktoren (Einfluss auf die Zusammensetzung fucosylierter HMOS) [239], Früh- oder Reifgeburt [278] sowie der Laktationsstatus [275, 279]. Als Richtwert kann eine HMOS-Konzentration von 20–25 g/L in der Kolostralmilch und 5–20 g/L in reifer Milch angesehen werden, wobei der Anteil fucosylierter (neutraler) HMOS zwischen 50–80 % und der sialylierter (saurer) HMOS zwischen 10–20 % liegt [239]. Die Konzentration von OS-gebundener Sialinsäure in Säuglingsnahrung beträgt ca. 0,043 g/L. Demgegenüber enthält reife Muttermilch jedoch ca. die 8-fache Menge [280]. In humaner Kolostralmilch wurden sogar Konzentrationen von 1,15 g/L (Reifgeborene) bzw. 1,32 g/L (Frühgeborene) nachgewiesen [278]. Zudem liegt in Säuglingsnahrung der überwiegende Teil an Sialinsäure proteingebunden vor (ca. 70 %), während dies in Humanmilch nur knapp 25 % sind [278]. Trotz eines erhöhten Sialinsäuregehaltes (frei, OS- und proteingebunden) in Frühgeborennahrung (ca. 0,2 g/L vs. ca. 0,13 g/L in Standardnahrung), beträgt die Konzentration generell nur ca. 1/10 der von Muttermilch [278].

Aufgrund dieser Unterschiede und der Bedeutung von Sialinsäure für die Entwicklung des Gehirns [281] sowie der vorbeugenden Wirkung gegen nekrotisierende Enterokolitis [282, 283], gibt es Bestrebungen, die neutralen GOS zu modifizieren und mit Hilfe von trans-Sialidasen (EC 3.2.1.18) oder Sialyltransferasen (EC 2.4.99.1) die Strukturdiversität von GOS-Mischungen durch Erzeugung sogenannter Sia-GOS weiter zu erhöhen bzw. den Strukturen in der humanen Muttermilch anzugleichen [272, 284–286]. Hierfür kann beispielsweise Caseinmakropeptid (CMP) als Sialinsäure-Donor genutzt werden [272, 287]. Die Tabelle 2-15 stellt bis dato durchgeführte Transsialylierungen von GOS gegenüber. Aufgrund dessen, dass die Untersuchungen bisher eher grundlegender Natur waren, gibt es oft keine Aussage bezüglich des tatsächlichen Anteils gebildeter Sia-GOS ( $Y_A$  in Tabelle 2-15). Um die Ausbeute an Sia-GOS zu maximieren, scheint es jedoch von Vorteil zu sein, mit einem Überschuss an Sia-Donor [272, 288, 289] zu arbeiten. Die meisten Untersuchungen fanden jedoch bisher mit einem Überschuss an Sia-Akzeptor (GOS) statt, um die Transferreaktion zu fördern [286].

Die trans-Sialidase aus *Trypanosoma cruzi* scheint eine sehr ausgeprägte Transsialylierungsaktivität aufzuweisen, da die Umwandlungsrate von GOS zu Sia-GOS bei 52 % lag, trotz Zugabe des Sia-Donors im Überschuss (5 mmol/L Neu5Ac zu 2 mmol/L GOS) [288]. Es stellten sich alle GOS-Fractionen (DP2–9) als geeignete Akzeptormoleküle heraus mit Umwandlungsraten von ca. 15–55 % und einer Präferenz für kurzkettige GOS (DP2–6). Bei GOS mit einem DP  $\geq 3$  wurden neben Mono-Sia-GOS (80–90 %) auch Di-Sia-GOS (10–20 %) gebildet (Behandlung einzelner GOS-Fractionen). Aufgrund des mit ca. 42 % hohen Anteils an Disacchariden (GOS und Lactose) in der verwendeten GOS-Mischung, betrug das Verhältnis von Mono- zu Di-Sia-GOS jedoch insgesamt nur 97:3 [272]. Die Sialylierung von 3'-, 4'- und 6'-Galactosyllactose zeigte, dass aufgrund sterischer Effekte nur an letztere auch eine Anknüpfung von zwei Neu5Ac-Molekülen, d. h. sowohl an das endständige als auch das mittlere Galactose-Molekül, möglich ist [289].

In einer weiteren Studie mit 6 kommerziellen GOS-Produkten als Akzeptorsubstrat, CMP als Sialinsäure-Donor und einer genetisch modifizierten, rekombinanten Sialidase aus *Trypanosoma rangeli* konnten Ausbeuten von 40–60 % (bezogen auf den verfügbaren Sialinsäureanteil in CMP) erreicht werden [286]. Bezogen auf die gebildeten Sia-GOS lag die Ausbeute aufgrund des enormen Akzeptorüberschusses jedoch bei maximal 2,3 %. GOS mit einem DP von 2–12 konnten als

Akzeptormoleküle genutzt werden, wobei die höheren Sialylierungsraten der Di- und Trisaccharide auf deren erhöhtem Anteil an den Gesamt-GOS zurückgeführt wurde. Eine Präferenz für bestimmte GOS-Fractionen wurde im Gegensatz zu Wilbrink et al. [272] nicht gefunden. Ebenso fand keine Bildung von Di-Sia-GOS statt. Neben GOS fungiert auch die in unaufgereinigten GOS-Produkten enthaltene Lactose als Akzeptormolekül, sodass bei dieser Reaktion auch 3'- und 6'-Sialyllactose entstehen, welche in humaner Muttermilch zu 0,4–0,8 g/L vorkommen [287].

**Tabelle 2-15:** Literaturdaten zur Transsialylierung von GOS, k. A. = keine Angabe.

Enzym <sup>a</sup>	Sia-Donor <sup>b</sup>	Sia-Akzeptor <sup>c</sup>	D/A	Y <sub>D</sub> [%] <sup>f</sup>	Y <sub>A</sub> [%] <sup>g</sup>	Verknüpfung <sup>h</sup>	Ref.
TS-Tc	CMP	Vivinal GOS	5:2 <sup>d</sup>	k. A.	52	α(2→3)	[272, 288]
TS-Tc	CMP	3',4',6'-GL	5:2 <sup>d</sup>	k. A.	20–25	α(2→3)	[289]
TS-Tc	CMP	GOS	1:10 <sup>d</sup>	k. A.	k. A.	α(2→3)	[284]
S-Tr13	CMP	versch. GOS	1:24–36 <sup>d</sup>	40–60	max. 2,3	k. A. <sup>i</sup>	[286]
S-Tr13	CMP	GOS	1:44 <sup>e</sup>	25	0,44	α(2→3)	[286, 290]
ST-Pm	CMP	GOS	1:17 <sup>e</sup>	k. A.	k. A.	α(2→3), α(2→6)	[287]

<sup>a</sup> TS = trans-Sialidase, S = Sialidase, ST = Sialyltransferase, Tc = *Trypanosoma cruzi* rekombinant in *E. coli*, Tr13 = *Trypanosoma rangeli* rekombinant in *Pichia pastoris*, Pm = *Pasteurella multocida* rekombinant in *E. coli*.

<sup>b</sup> CMP = Caseinmakropeptid. <sup>c</sup> GOS = nicht näher spezifiziertes GOS-Produkt, GL = Galactosyllactose, versch. GOS = Cup Oligo P, Vivinal GOS, Vivinal GOS 10, GOS-570-P, GOS-700-P, Bimuno. <sup>d</sup> molares Donor/Akzeptor-Verhältnis, bezogen auf den α(2→3)-verknüpften Sialinsäuregehalt im CMP. <sup>e</sup> molares Donor/Akzeptor-Verhältnis, bezogen auf α(2→3)- und α(2→6)-verknüpfte Sialinsäure im CMP. <sup>f</sup> Ausbeute bezogen auf Sia-Donor (Anteil transferierter Sialinsäure zu verfügbarer Sialinsäure). <sup>g</sup> Ausbeute bezogen auf Sia-Akzeptor (Anteil umgewandelter GOS zu Sia-GOS). <sup>h</sup> vom Enzym hydrolysierbare bzw. gebildete glykosidische Bindung. <sup>i</sup> Verknüpfung nicht untersucht, Y<sub>D</sub> bezieht sich jedoch nur auf den Anteil α(2→3)-verknüpfter Sialinsäure, da angenommen wird, dass α(2→6)-verknüpfte Sialinsäure nicht genutzt werden kann.

In einer Studie mit neugeborenen Ratten konnte gezeigt werden, dass α(2→3)-Sia-GOS eine protektive Wirkung gegen nekrotisierende Enterokolitis aufweisen, die vergleichbar zu 2'-FL ist [282]. Nicht sialylierte GOS zeigten jedoch keine Wirkung. Demnach ist die Sialylierung von GOS ein wichtiger Forschungsansatz.

Neben der Nutzung von bereits synthetisierten GOS als Akzeptoren gibt es weiterhin Untersuchungen, die während der GOS-Synthese mit β-Galactosidase zusätzlich zu Lactose als Galactosyl-Donor weitere HMOS-Monomere als Akzeptor hinzufügen (Erzeugung sogenannter Heterooligosaccharide (HeOS)). Im Unterschied zu den Strukturen in humaner Muttermilch befindet sich das Fucose- bzw. GlcNAc-Monomer jedoch in diesem Fall am reduzierenden Ende. Aufgrund der höheren Kosten des Akzeptors wird die Ausbeute an HeOS häufig auf diesen bezogen (Y<sub>HeOS,A</sub> in Tabelle 2-16), so z. B. in [291]. Einige Autoren normieren die Ausbeute allerdings auf die anfängliche Lactosekonzentration, d. h. das Donorsubstrat [292], sodass beim Vergleich verschiedener Publikationen diesem Umstand besondere Beachtung zu schenken ist. In Tabelle 2-16 ist die Ausbeute an HeOS als auch die der Gesamt-Oligosaccharide (HeOS und GOS) des Weiteren auf den Materialeinsatz insgesamt (Akzeptor und Donor) bezogen (Y<sub>HeOS,ges</sub> bzw. Y<sub>OS,ges</sub>), da sowohl HeOS als auch GOS die wertgebende Zielkomponente darstellen. Es sei weiterhin bemerkt, dass es bei der Synthese von HeOS üblich ist, die molare Ausbeute anzugeben, während bei der GOS-Synthese überwiegend die gewichtsbezogene Ausbeute angegeben wird.

**Tabelle 2-16:** Synthese von Heterooligosacchariden (HeOS) mit  $\beta$ -Galactosidasen verschiedener Enzymquellen und den Akzeptorsubstraten Fucose und N-Acetylglucosamin (GlcNAc), Donor = Lactose, k. A. = keine Angabe.

Enzymquelle	Akzeptor	$c_{\text{ges}}^a$ [mol/L]	D/A <sup>b</sup>	DH <sup>c</sup> [%]	$Y_{\text{HeOS,A}}^d$ [%]	$Y_{\text{HeOS,ges}}^e$ [%]	$Y_{\text{OS,ges}}^f$ [%]	HeOS <sup>g</sup> [%]	Ref.
<i>Bacillus circulans</i>	Fucose	3,2	1,2:1	k. A.	36	17	38	44	[293]
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Fucose	1,1	2,2:1	80	73	23	k. A.	k. A.	[294]
<i>Lactobacillus ruminis</i>	Fucose	1,1	2,2:1	73	56	18	k. A.	k. A.	[294]
<i>Bifidobacterium longum</i>	Fucose	1,1	2,2:1	74	62	20	k. A.	k. A.	[294]
<i>Aspergillus oryzae</i>	GlcNAc	2,0	1:1	53	$\geq 17^h$	$\geq 9^h$	18	$\geq 48^h$	[292]
<i>Bacillus circulans</i>	GlcNAc	1,0	1:1	70	40	20	27,5	73	[295]
<i>Bacillus circulans</i>	GlcNAc	0,6	1:10	k. A.	3,2 <sup>j</sup>	2,9 <sup>j</sup>	k. A.	k. A.	[296]
<i>Bifidobacterium breve</i>	GlcNAc	1,2	1:1	k. A.	$\geq 24^i$	$\geq 12^i$	k. A.	k. A.	[291]
<i>Bifidobacterium longum</i>	GlcNAc	0,7	6:1	71	62	9	k. A.	k. A.	[294]
<i>Escherichia coli</i>	GlcNAc	1,0	1:1	39	$\geq 27^h$	$\geq 13^h$	16	$\geq 85^h$	[292]
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	GlcNAc	2,0	1:1	k. A.	$\geq 41^i$	$\geq 21^i$	k. A.	k. A.	[291]
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	GlcNAc	0,7	6:1	65	45	6	k. A.	k. A.	[294]
<i>Lactobacillus ruminis</i>	GlcNAc	0,7	6:1	66	34	5	k. A.	k. A.	[294]
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	GlcNAc	2,0	1:1	k. A.	k. A.	k. A.	24	40 <sup>k</sup>	[292]

<sup>a</sup> Gesamtkonzentration an Donor (Lactose) und Akzeptor (Fucose bzw. GlcNAc), gerundet. <sup>b</sup> molares Donor/Akzeptor-Verhältnis. <sup>c</sup> Lactosehydrolysegrad, entspricht Donornutzung. <sup>d</sup> molare Ausbeute (Y) an HeOS bezogen auf den Akzeptor (A), entspricht Akzeptornutzung unter der Annahme, dass ausschließlich mono-HeOS gebildet werden. <sup>e</sup> molare Ausbeute (Y) an HeOS bezogen auf den Gesamtzucker  $c_{\text{ges}}$ . <sup>f</sup> molare Ausbeute an Gesamt-Oligosacchariden (OS = GOS + HeOS) bezogen auf den Gesamtzucker  $c_{\text{ges}}$ . <sup>g</sup> prozentualer Anteil der HeOS an den Gesamt-Oligosacchariden. <sup>h</sup> nur bezogen auf die drei identifizierten GlcNAc-GOS-Disaccharide. <sup>i</sup> nur Allo-LacNAc. <sup>j</sup> nur LacNAc. <sup>k</sup> Schätzung anhand Abb. 5.

Die meisten Untersuchungen wurden aufgrund seiner starken Transgalactosylierungsaktivität mit  $\beta$ -Galactosidase aus *B. circulans* durchgeführt [293, 295, 296], wobei sowohl Fucose [293], GlcNAc [295, 296], aber auch Lacto-N-triose II (GlcNAc- $\beta$ (1 $\rightarrow$ 3)-Lac, LNT2) [296] als Akzeptormoleküle verwendet wurden. Bei leichtem Lactose-Überschuss ergab sich eine Fucosylierung aller gebildeten

GOS von 44 % und aller Disaccharide von 30 %, wovon den größten Anteil (ca. 70 %) Gal- $\beta$ (1 $\rightarrow$ 3)-Fuc ausmachte [293]. Mit GlcNAc als Akzeptormolekül konnte eine vergleichbare Ausbeute von ca. 40 % GlcNAc-GOS erreicht werden [295]. Vermutlich aufgrund stark unterschiedlicher Anfangskonzentrationen (3,2 mol/L vs. 1,0 mol/L, Tabelle 2-16) betrug die GOS-Ausbeute mit ca. 7,5 % nur knapp 1/3 derer, die parallel zur Fucosylierung erzielt wurde. Somit war zwar der Anteil der HeOS an den Gesamt-OS mit ca. 73 % höher, die Gesamtausbeute an Prebiotika (GOS und HeOS) war jedoch deutlich geringer (38 % vs. 27,5 %, Tabelle 2-16). Zusätzlich zu den GOS-Strukturen Allolactose und 4'-GL, wurden GlcNAc-haltige Di-, Tri- und Tetrasaccharide nachgewiesen, welche vorrangig  $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4)-glykosidisch verknüpft waren (Tabelle 2-17). Neben dem Hauptprodukt LacNAc mit ca. 29 % der Gesamtzucker wurden auch geringe Mengen (ca. 2 %) an Allo-LacNAc gebildet [295]. Im Unterschied dazu arbeiteten Zeuner et al. [296] mit 10-fachem Akzeptorüberschuss, um die ausschließliche Bildung von LacNAc zu forcieren. Sie erzielten jedoch nur eine maximale Ausbeute von 2,9 %. Demnach scheint es wirtschaftlich sinnvoller, mit einem ausgeglichenen D/A-Verhältnis zu arbeiten und die parallele, aber unterdrückte Synthese von GOS in Kauf zu nehmen. LNT2 (D/A 1:5) stellte sich als wenig geeigneter Galactosyl-Akzeptor heraus mit einer akzeptorbezogenen LNnT-Ausbeute (Gal- $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4)-LNT2) von max. 1,4 % [296]. Sowohl LacNAc als auch LNnT sind von besonderem Interesse, da sie Grundbausteine der HMOS darstellen (Abbildung 2-5). Die  $\beta$ (1 $\rightarrow$ 6)-verknüpfte Allo-LacNAc ist hingegen kein Bestandteil humaner Muttermilch. Sie ist jedoch das Hauptprodukt der meisten  $\beta$ -Galactosidasen (Tabelle 2-17).

**Tabelle 2-17:** Identifizierte Strukturen bei der Synthese von GlcNAc-haltigen HeOS mittels  $\beta$ -Galactidasen verschiedener Enzymquellen (offene Symbole = nachgewiesene Struktur, volle Symbole = Hauptprodukt).

HeOS-Struktur <sup>a</sup> /Enzymquelle <sup>b</sup> [Referenz]	A.o. [292]	B.b. [291]	B.c. [295]	E.c. [292]	L.b. [291]	S.s. [292]
Gal- $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4)-GlcNAc (LacNAc)	○		●			○
Gal- $\beta$ (1 $\rightarrow$ 6)-GlcNAc (Allo-LacNAc)	●	●	○	●	●	●
Gal- $\beta$ (1 $\rightarrow$ 3)-GlcNAc (Lacto-N-biose)	○			○		○
Gal- $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4)-Gal- $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4)-GlcNAc			○			
Gal- $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4)-Gal- $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4)-Gal- $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4)-GlcNAc			○			

<sup>a</sup> LacNAc und Lacto-N-biose sind Grundstrukturen der HMOS (Abbildung 2-5). <sup>b</sup> A.o. = *Aspergillus oryzae*, B.b. = *Bifidobacterium breve*, B.c. = *Bacillus circulans*, E.c. = *Escherichia coli*, L.b. = *Lactobacillus bulgaricus*, S.s. = *Sulfolobus solfataricus*.

Auch mit  $\beta$ -Galactosidase-Extrakten aus verschiedenen Laktobazillen- und Bifidobakterien-Stämmen konnte die Synthese von HeOS realisiert werden [294]. Im Vergleich zur alleinigen GOS-Synthese nahm die Transgalactosylierung tendenziell bei Anwesenheit von Fucose leicht zu und bei Anwesenheit von GlcNAc leicht ab. Es wurde keine Ausbeute angegeben, jedoch lässt sich anhand der Akzeptornutzung und der Annahme, dass der Verbrauch von 1 mol Akzeptor zur Entstehung von

1 mol HeOS führt (d. h. keine Bildung von Di-HeOS), eine Ausbeute ( $Y_{\text{HeOS, ges}}$ ) von 18–23 % für Fucose-GOS und von 5–9 % für GlcNAc-GOS berechnen (Tabelle 2-16). Anhand der Chromatogramme kann weiterhin vermutet werden, dass die Gesamtausbeute (HeOS und GOS) deutlich höher liegt und HeOS somit nur einen geringen Anteil an den Gesamt-OS ausmachen. Sialinsäure führte zur Inhibition der Enzyme und folglich keiner Synthese von GOS und/oder Sia-GOS [294].

Die Untersuchung rekombinanter, aufgereinigter  $\beta$ -Galactosidasen aus *L. bulgaricus* und *B. breve* zeigte, dass GlcNAc im Vergleich zu Lactose und Glucose als Galactosyl-Akzeptor präferiert wird, Fucose hingegen weniger gut geeignet ist [291]. Somit führte die Anwesenheit von GlcNAc zu einer verringerten Bildung des GOS-Disaccharids 6'-Galactobiose sowie von GOS-Trisacchariden, genaue Ausbeuten wurden jedoch nicht angegeben. Als Hauptprodukt wurde das Disaccharid Allo-LacNAc mit Ausbeuten ( $Y_A$ ) von 41 % bzw. 24 % mit *L. bulgaricus* bzw. *B. breve* identifiziert (Tabelle 2-17). Auch GlcNAc-haltige Trisaccharide wurden nachgewiesen, allerdings nicht genauer charakterisiert bzw. quantifiziert.

Umfassende Untersuchungen zur Erzeugung von GlcNAc-GOS wurden auch mit  $\beta$ -Galactosidasen aus *A. oryzae*, *E. coli* und *S. solfataricus* durchgeführt. Hohe Substratkonzentrationen und ein ausgewogenes D/A-Verhältnis begünstigten die OS-Synthese [292]. Die mit 24 % höchste OS-Ausbeute konnte mit *S. solfataricus* erzielt werden, wobei sich der Anteil der HeOS mit den gegebenen Daten nicht genau berechnen lässt, jedoch mit etwa 40 % abgeschätzt werden kann. Dies ist vergleichbar mit der GlcNAc-Präferenz von *A. oryzae* (HeOS:GOS ca. 48:52). Das Enzym aus *E. coli* hingegen weist die stärkste Affinität zum GlcNAc-Akzeptor auf, was in der fast ausschließlichen Bildung von Allo-LacNAc (85 % der Gesamt-OS) resultiert.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Ausbeuten bei der Erzeugung von Fucose-GOS relativ unabhängig von der verwendeten  $\beta$ -Galactosidase bei ca. 20 % liegen (17–23 %), während die Synthese von GlcNAc-GOS mit Ausbeuten von 5–21 % stark von der Enzymquelle abhängt ( $Y_{\text{HeOS, ges}}$ , Tabelle 2-16). Das *B. circulans*-Enzym scheint aufgrund seiner Präferenz für  $\beta(1\rightarrow4)$ -glykosidische Bindungen besonders geeignet für die Synthese von HeOS, da es vorrangig LacNAc erzeugt (Tabelle 2-17), eine der Grundstrukturen von humanen Milcholigosacchariden. Die Synthese von Sia-GOS durch  $\beta$ -Galactosidasen konnte bisher nicht realisiert werden [294] und scheint daher nur mit trans-Sialidasen oder Sialyltransferasen möglich zu sein (Tabelle 2-15).

Als Alternative zu GOS und GOS-Derivaten gibt es des Weiteren Bemühungen, aus Abfallströmen der Milchindustrie die darin enthaltenen bovinen Milcholigosaccharide (BMOS) zu gewinnen. Im Gegensatz zu Humanmilch entfällt jedoch mit ca. 70 % der Großteil der BMOS auf sialylierte OS. Fucosylierte OS sind nur in Spuren enthalten [239]. Weiterhin enthalten Sia-BMOS neben Neu5Ac auch Neu5Gc [274, 297], welches in Humanmilch nicht vorkommt und potenziell kanzerogen ist [281]. Mittels UF-Diafiltration von Mutterlauge (lactosearmes Molkenpermeat) konnte Sialyllactose (3'-SL und 6'-SL) um das 40-fache konzentriert und somit ein BMOS-angereichertes Pulver (2,8 % 3'- und 6'-SL, ca. 30 % Lactose, ca. 27 % nicht identifizierte Komponenten inkl. weiterer BMOS) gewonnen werden [298]. Ähnliche Untersuchungen wurden auch mit Ziegenmilch durchgeführt, welche mit ca. 0,24 g/L in etwa die 5-fache Menge an Oligosacchariden im Vergleich zu Kuhmilch enthält [238]. Nach Abtrennung der Proteine und anschließender 3-stufiger Diafiltration des entsprechenden Permeates, konnten 82 % der OS zurückgehalten und das Lactose/OS-Verhältnis um



den Faktor 14 gesteigert werden (Lactosedurchgang 94 %). Der OS-Anteil in der Trockenmasse wurde somit von 0,3 % auf 4,9 % erhöht [238].

Mit einem Anteil von ca. 20 % gehört 2'-Fucosyllactose (2'-FL) zu einem der Hauptoligosaccharide in humaner Muttermilch [282]. Bei Müttern aus Peru, Schweden und den USA wurden sogar Anteile an den Gesamt-HMOS von bis zu 50 % (2 Wochen bis 5 Monate postpartum) gemessen [277]. Mittlerweile können sowohl 2'-FL als auch Lacto-N-neotetraose (LNnT) biotechnologisch hergestellt werden. Beide Stoffe haben GRAS-Status und sind von der EFSA im Sinne der Novel Food-Verordnung 258/97 zugelassen [299-301]. Die Synthese erfolgt jedoch nicht mittels isolierter  $\beta$ -Galactosidasen, sondern mit Hilfe genetisch modifizierter, nicht-pathogener *E. coli*-Stämme, welche das Zielprodukt extrazellulär in das umgebende Medium ausschleusen [302-306]. Entsprechende 2'-FL-Produkte werden unter den Markennamen CARE4U™ (DuPont) [307], HiMO (Glycom A/S) [308], Aequival® 2'-FL (GlycoSyn®/Friesland Campina Domo) [309] und Mum's Sweet Secret (Jennewein Biotechnologie GmbH) [310] vertrieben. In Deutschland enthält bisher nur die Anfangs- und Folgenahrung der Produktreihe BEBA® Supreme von Nestlé Nutrition GmbH diese beiden HMOS (1 g/L 2'-FL und 0,5 g/L LNnT bezogen auf die trinkfertige Nahrung). Im Gegensatz zu anderen Herstellern enthält jedoch keine der Nestlé-Ersatznahrungen GOS oder FOS [244]. Ebenso ist 2'-FL in Kombination mit FOS in einigen Produkten der Marke Similac® von Abbott enthalten [311]. Säuglingsnahrungen, welche sowohl GOS als auch HMOS enthalten, sind bis dato nicht bekannt. Es wird jedoch erwartet, dass die industrielle Produktion von HMOS zunehmend an Bedeutung gewinnen wird.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Materialien

#### 3.1.1 Verwendete Enzyme

Die  $\beta$ -Galactosidase-Enzyme stammten aus *Aspergillus oryzae* (opti-lactase A50 von Optiferm GmbH; Maxilact A4 von DSM Food Specialties B.V.; Dairyzym F50P von SternEnzym GmbH & Co. KG) und *Kluyveromyces lactis* (opti-lactase LX2 von Optiferm GmbH; Maxilact LX5000 von DSM Food Specialties B.V.; Lactozym Pure 6500L von Novozymes A/S; Dairyzym Y50L von SternEnzym GmbH & Co. KG). Glucose-Oxidase war von Shin Nihon Chemical Co., Ltd. (Sumizyme PGO aus *Penicillium chrysogenum*) und Katalase von Sigma Aldrich (isoliert aus *Micrococcus lysodeikticus*).

#### 3.1.2 Verwendete Mikroorganismen

Die *Lactobacillus*-Kulturen stammten von Sacco S.r.l. (Cadorago, Italien). Folgende Stämme wurden untersucht: *Lactobacillus acidophilus* LA3, *Lactobacillus bulgaricus* LB4, LB8 und SP5 sowie *Lactobacillus reuteri* LR92. *Cryptococcus laurentii* (DSM 27153) wurde beim Leibniz Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig) bestellt. Alle Stämme wurden im jeweils empfohlenen Nährmedium angezogen, mit Glycerin (finale Konzentration 50 %) versetzt und bei -20°C bis zur Verwendung gelagert.

#### 3.1.3 Verwendete Molkeproben

Süß- und Sauermolke wurden aus Pulver (Süßmolke: Molkerei Meggle Wasserburg GmbH & Co. KG (Wasserburg) bzw. Milchwerke "Mittelelbe" GmbH (Stendal), Sauermolke: Euroduna Food Ingredients GmbH (Barmstedt)) rekonstituiert. Zusätzlich wurde Sauermolke aus kommerzieller Magermilch mittels Milchsäure-Fällung auf pH 4,6 (sogenannte Caseinmolke) bzw. 3-stündiger Fermentation (Joghurtkultur YO-MIX® 621 von Danisco) und anschließendem Abtropfen (über Nacht) in einem Tuch (sogenannte Griechische Joghurt-Molke) erhalten. Konzentriertes Sauermolkenpermeat wurde von Arla Foods Deutschland GmbH bereitgestellt.

#### 3.1.4 Verwendete Geräte

Alle verwendeten Geräte sind in Tabelle A.7-6 aufgeführt bzw. im Text genannt.

### 3.2 Bestimmung der Inhaltsstoffe von Molke

Der Proteingehalt sowie der Gehalt an Nicht-Protein-Stickstoff (NPN, engl. *non-protein nitrogen*) wurde über die Stickstoff-Bestimmung nach Kjeldahl [312] ermittelt. Der NPN-Gehalt wurde nach Fällung der Proteine mit 48 %-iger Trichloressigsäure bestimmt (Endkonzentration: 11,6 %). Die verwendeten Umrechnungsfaktoren für Reineiweiß (Gesamtprotein nach Abzug des NPN) waren 6,41 für Süßmolke und 6,28 für Sauermolke gemäß Van Boekel & Ribadeau-Dumas [313]. Für den NPN-Gehalt wurde ein Faktor von 3,6 verwendet [314]. Die Fettbestimmung erfolgte nach Weibull-Stoldt [315]. Die Quantifizierung der Zucker (Lactose, Glucose, Galactose) wurde mittels HPLC auf der Säule Hi-Plex Na von Agilent Technologies durchgeführt. Der Mineralstoffgehalt wurde durch Veraschung

im Muffelofen bei 550°C sowie einer Analyse der Milchsäure mittels Ionenchromatographie bestimmt. Für letzteres wurde ein DX-100 (Dionex Corp.) bzw. ein Aquion™ (Thermo Fisher Scientific GmbH) Ionenchromatograph eingesetzt. Für die Analytik der Kationen ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  und  $\text{Ca}^{2+}$ ) wurde die Säule IonPac CS12A (4 mm x 250 mm, Thermo Fisher Scientific GmbH) mit 20 mmol/L Methansulfonsäure als Elutionsmittel verwendet. Die Trennung der Anionen ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ) und Milchsäure erfolgte auf der IonPac AS14-Säule (4 mm x 250 mm, Thermo Fisher Scientific GmbH) mit dem Eluenten 3,5 mmol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  und 1 mmol/L  $\text{NaHCO}_3$ . Die Flussrate betrug jeweils 1 mL/min. Die Probenaufgabe wurde über eine 25 µL-Schleife realisiert. Die Steuerung und Auswertung erfolgte mit der Software Chromeleon 6.70 SP7 von Dionex Corp. (DX-100) bzw. Chromeleon 7.2 SR5 von Thermo Fisher Scientific GmbH (Aquion™). Die Quantifizierung wurde durch eine externe Kalibrierung im Bereich 1–20 mg/L (Kationen) bzw. 2–20 mg/L (Anionen und Milchsäure) mit Standards von Merck KGaA bzw. Carl Roth GmbH (Milchsäure) realisiert.

### 3.3 Mikroorganismenkultivierung und Enzymgewinnung

#### 3.3.1 Biochemische Analysenmethoden

Als Maß für das Mikroorganismenwachstum diente die optische Dichte bei 600 nm gegen steriles, unbewachsenes Kulturmedium ( $\text{OD}_{600}$ , ab  $\text{OD}_{600} = 0,5$  wurde mit Kulturmedium verdünnt, Photometer Genesys 10S UV-Vis von Thermo Fisher Scientific GmbH) sowie die Biotrockenmasse (BTM). Diese wurde mittels Membranfiltermethode (Cellulose-Nitrat-Filter 0,45 µm, Sartorius AG) bestimmt. Der Filter wurde hierfür mit 10 mL deion. Wasser gewaschen, über Nacht im Exsikkator getrocknet und anschließend ausgewogen. Nach Filtration eines definierten Probenvolumens (15 mL für *L. bulgaricus*, 2 mL für *C. laurentii*) wurden anhaftende Medienbestandteile mit 10 mL deion. Wasser ausgewaschen und die Filter erneut für ca. 24 h im Exsikkator getrocknet und ausgewogen. Der pH-Wert wurde im Zentrifugationsüberstand (25.000 g, 10 min, 4°C) gemessen (Modell pH537 von WTW GmbH). Die Bestimmung des Gesamtproteins erfolgte photometrisch bei 595 nm nach Bradford [316] nach Kalibrierung mit bovinem Serumalbumin (Bradford-Reagenz Roti®-Quant von Carl Roth GmbH).

#### 3.3.2 Herstellung der Rohextrakte aus *Lactobacillus* sp.

Für die Versuche zur Charakterisierung der  $\beta$ -Galactosidasen aus *Lactobacillus* sp. wurden Zellen aus einer 24-stündigen Kultivierung (Lactose-MRS-Medium (Zusammensetzung siehe Tabelle A.7-7), statisch, 37°C, ca. 150–200 mL Arbeitsvolumen, Gesamtvolumen ca. 3–4 L) mittels Zentrifugation bei 24.000 g in einer Durchlaufzentrifuge (Biofuge 28 RS, Heraeus Sepatech) gewonnen. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit Extraktionspuffer gewaschen, abzentrifugiert (4°C, 25.000 g, 10 min, Zentrifuge Sigma 3K30), in 200 mL Extraktionspuffer gelöst und im Homogenisator (PANDA, GEA Niro Soavi) bei 100 MPa in 5 Stufen (mit Zwischenkühlung auf Eis auf unter 15°C) aufgeschlossen. Die Temperatur der Zelllösung stieg während des Prozesses nicht über 35°C. Nach Abtrennung der Zellfragmente (4°C, 25.000 g, 10 min) wurde der Überstand in einem Vivacell-Filtrationssystem (für 250 mL, PES-Membran, MWCO: 50 kDa) bei 0,4 MPa eingeengt (Beaufschlagung mit Stickstoff). Zur Stabilisierung der  $\beta$ -Galactosidase enthaltenden Rohextrakte wurde Glycerin bis zu einer finalen Konzentration von 50 % (w/w) hinzugegeben.

Für die Versuche zur GOS-Synthese mit *L. bulgaricus* LB4 wurden die Zellen nach der Ernte (Zentrifugation bei 4°C, 25.000 g für 10 min) mit Puffer (50 mmol/L Na-Phosphat pH 6,8) gewaschen, anschließend mit Extraktionspuffer (50 mmol/L Na-Phosphat pH 6,8, 20 % Glycerol) versetzt und mechanisch im Disruptor Genie (Scientific Industries Inc.) aufgeschlossen. Hierfür wurden 0,5 mL Zellsuspension zu 0,2 g Glaskugeln ( $\varnothing$  0,1 mm) gegeben (2 mL-Reaktionsgefäß) und für 3 x 10 min mit mind. 10-minütiger Zwischenkühlung im Eiswasserbad bei 2.850 1/min behandelt. Nach dem Aufschluss wurden die Zellfragmente mittels Zentrifugation abgetrennt. Diese Methode wurde auch für die Bestimmung der gebildeten Enzymmenge bei den Untersuchungen zur Enzymproduktion verwendet.

### 3.3.3 Kultivierung im Labormaßstab

#### 3.3.3.1 *Lactobacillus bulgaricus* LB4

Um eine kosher- bzw. halal-gerechte Kultivierung des ausgewählten Stammes (*Lactobacillus bulgaricus* LB4) zu ermöglichen, musste das Standard-MRS-Medium (siehe Tabelle A.7-7) entsprechend modifiziert werden. Im ersten Schritt wurden die fleischhaltigen Komponenten (Fleischextraktpaste und Fleischpepton) durch je 10 g/L Soja- bzw. Caseinpepton (beide von Otto Nordwald GmbH) ersetzt. Im nächsten Schritt wurden zwei Hefeextrakte (von Bio Springer S.A. und Ohly GmbH) und drei Caseinpeptone (von Organotechnie S.A.S., Solabia und TATUA/Sensient), welche entsprechend kosher- und halal-zertifiziert waren, auf ihre Eignung untersucht. Da Wechselwirkungseffekte nicht auszuschließen sind, wurden alle sechs möglichen Kombinationen sowie Hefeextrakt bzw. Caseinpepton als alleinige komplexe Stickstoffquelle untersucht. Zum Vergleich wurde ein sogenanntes basal-Medium ohne komplexe Stickstoffquelle sowie das Standard-Medium mitgeführt. Die Proben wurden ebenfalls hinsichtlich Gesamtstickstoff (Kjeldahl),  $\alpha$ -Aminostickstoff (OPA-Methode nach Nielsen et al. [317], Standard: Leucin) und Größenverteilung der Peptide (Größenausschlusschromatographie, Säule: Superose®12, Eluent: 50 mmol/L Na-Phosphat pH 6,2, Detektion bei 280 nm) charakterisiert.

Die Kultivierung erfolgt mit 40 mL Medium im Erlenmeyer-Kolben (Volumen: 100 mL) bei 37°C und 50 1/min über 15 h (Hauptkultur). Inokuliert wurde mit 1,5 % einer in Standard-MRS doppelt gezogenen Vorkultur. Zur Vermeidung von unspezifischen Maillard-Reaktionen während des Autoklavierens, welche möglicherweise Unterschiede im Mikroorganismenwachstum bzw. der  $\beta$ -Galactosidase-Bildung bedingen würden, wurden alle N-Quellen (Hefeextrakte, Caseinpeptone, Sojapepton, Fleischpepton, Fleischextraktpaste) und Lactose getrennt von den übrigen Medien-Bestandteilen autoklaviert und unter sterilen Bedingungen in entsprechenden Verhältnissen gemischt, sodass sich die in Tabelle A.7-7 genannten Konzentrationen ergaben. Die pH-Wert-Einstellung (auf 6,2) aller Lösungen erfolgte vor dem Autoklavieren. Zur Bestimmung der gebildeten Enzymmenge, wurde ein definiertes Volumen (ca. 24 mL) der Kulturlösung zentrifugiert, 1 mal mit 10 mL Extraktionspuffer gewaschen und anschließend in einem definierten Volumen an Extraktionspuffer (mind. 0,5 mL) resuspendiert, um eine BTM-Konzentration von 0,015 g/mL für den Zellaufschluss zu erhalten. Aufgrund zum Teil sehr schlechten Wachstums konnte diese Vorgabe jedoch nicht immer eingehalten werden.

Des Weiteren wurde Magermilch (kommerziell erhältliche UHT-Milch, pH 6,66) als Kulturmedium in gleicher Weise untersucht. Zur Beurteilung des Mikroorganismenwachstums wurde hierbei der pH-

Wert herangezogen. Die Bestimmung der  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität erfolgte durch Zentrifugation von 25 mL Medium, Lösen des Pellets in 15 mL Extraktionspuffer und anschließendem Zellaufschluss im Disruptor Genie.

### 3.3.3.2 *Cryptococcus laurentii*

Die Kultivierung von *Cryptococcus laurentii* erfolgte in Anlehnung an Ohtsuka et al. [65] in folgendem Nährmedium: 2 % Lactose, 0,5 %  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,1 % Hefeextrakt, 0,2 % Fleischextraktpaste, 0,1 %  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  und 0,05 %  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ . Der pH-Wert wurde vor dem Autoklavieren ( $121^\circ\text{C}$ , 20 min) auf pH 6,0 eingestellt. Die Vorkultur wurde mit 200  $\mu\text{L}$  einer zuvor angelegten Glycerinkultur beimpft und in einem 100 mL Erlenmeyerkolben (Füllvolumen: 15 mL) bei  $30^\circ\text{C}$  und 160 1/min in einem Inkubationsschüttler (Modell KS 4000 i control, IKA®-Werke GmbH & Co. KG) über 24 h gezogen. Die Hauptkultur (100 mL Bouillon in 500 mL-Erlenmeyerkolben) wurde mit 2 % der Vorkultur beimpft und ebenfalls bei  $30^\circ\text{C}$  und 160 1/min inkubiert. Hierfür wurden zeitlich versetzt je 5 Kolben beimpft, um das Wachstum über einen längeren Zeitraum verfolgen zu können. Zu definieren Zeiten (Reihe 1: 24, 30, 48, 54 und 72 h, Reihe 2: 72, 78, 96, 102 und 120 h) wurde jeweils ein Kolben entnommen und  $\text{OD}_{600}$ , BTM (als Doppelbestimmung) und  $\beta$ -Galactosidaseaktivität (als Dreifachbestimmung) gemessen. Für die Bestimmung der Enzymaktivität wurden die Zellen aus je 25 mL Kulturmedium abzentrifugiert (25.000 g, 10 min,  $4^\circ\text{C}$ ), einmal mit 5 mL Puffer (50 mmol/L Na-Phosphat pH 5,0) gewaschen und anschließend in 5 mL Puffer resuspendiert (Minishaker MS 1, IKA®-Werke GmbH & Co. KG). Die stationäre Wachstumsphase wird nach ca. 75 h erreicht (siehe Abbildung A.7-7).

### 3.3.4 Kultivierung im Fermentormaßstab (*L. bulgaricus* LB4)

Die Kultivierung erfolgte in einem BioStat B-Fermentationsystem (Sartorius Stedim Systems GmbH), welches mit einem 1,5 L-Gefäß (Arbeitsvolumen: 1 L) ausgestattet war. Der Fermentor wurde mit 1 L Medium (Lactose-Caseinpepton-MRS) befüllt und bei  $121^\circ\text{C}$  für 20 min autoklaviert (Varioklav 75S). Die pH- und  $\text{pO}_2$ -Sonden wurden vor jedem Versuch kalibriert. Die Hauptkultur wurde mit 15 mL einer über Nacht im selben Medium gezogenen Vorkultur beimpft. Zu bestimmten Zeitabständen wurden Proben (bis 3 h ca. 15 mL, ab 3 h ca. 40 mL) entnommen und pH-Wert, BTM,  $\text{OD}_{600}$  (gegen autoklaviertes Medium),  $\beta$ -Galactosidase- und Gesamtproteinbildung (nach Bradford [316]) bestimmt. Die Fermentationen wurde ohne pH- und  $\text{pO}_2$ -Regelung, unter Begasung mit synthetischer Luft (max. 0,6 L/min,  $\text{pO}_2 > 80\%$ ), unter anaeroben Bedingungen (konstante Begasung mit Stickstoff mit 0,2 L/min) sowie unter pH-Stat-Bedingungen (pH 6,2, Regelung mittels 1 mol/L NaOH bzw. 1 mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , ohne  $\text{pO}_2$ -Regelung) durchgeführt. Die Fermentationstemperatur betrug  $37^\circ\text{C}$  und die Rührerdrehzahl 150 1/min. Die Begasung erfolgt über einen Begasungsring unterhalb des Rührers (6-Blatt-Scheibenrührer).

## 3.4 Assays zur Bestimmung der Enzymaktivität

### 3.4.1 $\beta$ -Galactosidase

Zur Bestimmung der Enzymaktivität der verschiedenen  $\beta$ -Galactosidasen wurde das chromogene Substrat oNPG verwendet. Die Substratlösung (oNPG in jeweiligem Puffer) wurde für mind. 10 min bei der gewählten Temperatur in einem Thermomixer vortemperierte. Nach der Zugabe entsprechend verdünnter Enzymlösung wurde für exakt 10 min bei 600 1/min inkubiert und die Reaktion anschlie-

ßend durch Zugabe der Stopplösung (0,4 mol/L  $\text{CaCO}_3$ ) beendet. Die Lösung wurde in Küvetten umgefüllt und bei 420 nm gegen einen mitgeführten Blindwert (Puffer anstelle der Probelösung) vermessen. Für die kommerziellen Enzyme sowie die Rohextrakte aus *Lactobacillus* sp. wurden 480 µL Substratlösung, 20 µL Probe und 750 µL Stopplösung verwendet, für *Cryptococcus laurentii* 700 µL Substratlösung, 50 µL Probe (Zelllösung) und 750 µL Stopplösung (1 mol/L  $\text{CaCO}_3$ ). Die Zellen wurden anschließend für 10 min in einer Zentrifuge für Eppendorf-Tubes (Modell VR-1 von Heraeus Instruments GmbH) abzentrifugiert, der Überstand in Küvetten umgefüllt und bei 420 nm gegen den Blindwert vermessen. Der Extinktionskoeffizient für das entstehende Produkt o-Nitrophenol wurde mit Hilfe einer Kalibrierreihe (o-Nitrophenol in einem Gemisch aus Substratpuffer und Stopplösung, Verhältnis entsprechend des jeweiligen Assays) bestimmt. Für die Berechnung der Enzymaktivitäten von *A. oryzae* wurde  $\epsilon = 0,0043 \text{ L}/\mu\text{mol}\cdot\text{cm}$ , für *K. lactis* und *Lactobacillus* sp.  $\epsilon = 0,0049 \text{ L}/\mu\text{mol}\cdot\text{cm}$  und für *C. laurentii*  $\epsilon = 0,0045 \text{ L}/\mu\text{mol}\cdot\text{cm}$  verwendet. Eine Unit ist definiert als die Enzymmenge, die 1 µmol o-Nitrophenol pro Minute unter den jeweiligen Assaybedingungen freisetzt.

### 3.4.2 Glucose-Oxidase

Die Bestimmung der Glucose-Oxidase-Aktivität erfolgte in Anlehnung an Sigma-Aldrich [318]. Hierfür wurden 460 µL Substratlösung (17,2 g/L Glucose und 0,21 mmol/L o-Dianisidin Dihydrochlorid in 50 mmol/L Na-Acetat-Puffer pH 4,5 bzw. PEM-Puffer pH 6,5) mind. 10 min bei der entsprechenden Temperatur im Thermomixer vortemperiert. Anschließend wurden 20 µL Peroxidase-Lösung (ca. 60 Units/mL) und 20 µL Glucose-Oxidase-Lösung (ca. 0,04–0,09 g/L) hinzugegeben, für 4 min inkubiert und mit 5 mol/L HCl (750 µL) abgestoppt. Der Blindwert wurde ohne Glucose-Oxidase, aber mit Peroxidase bereitet. Die Proben wurden in Küvetten umgefüllt und bei 530 nm ( $\epsilon = 0,0164 \text{ L}/\mu\text{mol}\cdot\text{cm}$ ) im Photometer vermessen. Eine Unit ist definiert als die Enzymmenge, die 1 µmol Glucose pro Minute unter den jeweiligen Assaybedingungen freisetzt.

### 3.4.3 Katalase

Die Bestimmung der Katalase-Aktivität erfolgte in Anlehnung an eine Methode von Sigma Aldrich [319]. Hierfür wurden 2,9 mL einer 0,036 %-igen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung mit 0,1 mL entsprechend verdünnter Katalase-Probe (Verdünnungen jeweils in PEM- bzw. Na-Acetat-Puffer) versetzt und in einer Quarzglasküvette bei 240 nm für 3 min im Abstand von 2 s vermessen. Aus dem linearen Abschnitt wurde die Extinktionsabnahme pro Minute bestimmt. Der Extinktionskoeffizient für  $\text{H}_2\text{O}_2$  wurde mit  $0,0434 \text{ L}/\mu\text{mol}\cdot\text{cm}$  angegeben [319]. Die Bestimmung erfolgte bei Raumtemperatur (ca. 20°C). Eine Unit ist definiert als die Enzymmenge, die 1 µmol  $\text{H}_2\text{O}_2$  pro Minute unter den jeweiligen Assaybedingungen umsetzt.

### 3.4.4 Berechnung der Enzymaktivität

Die Enzymaktivität (EA) wurde nach folgenden Gleichungen berechnet:

$$EA [U/mL] = \frac{E[1/cm] \cdot V_{Ansatz}[L]}{\varepsilon[L/\mu mol \cdot cm] \cdot t[min] \cdot V_{Probe}[mL]} \cdot VF \quad (1)$$

$$EA [U/g] = \frac{E[1/cm] \cdot V_{Ansatz}[L]}{\varepsilon[L/\mu mol \cdot cm] \cdot t[min] \cdot V_{Probe}[mL] \cdot c_{Stamm}[g/mL]} \cdot VF \quad (2)$$

Hierbei ist EA die Enzymaktivität in Units pro mL bzw. Units pro Gramm, E die Extinktion in 1/cm,  $V_{Ansatz}$  das Volumen des Reaktionsansatzes (Summe aus Volumen der Substratlösung, Volumen der Probe und Volumen der Stopplösung) in L,  $\varepsilon$  der Extinktionskoeffizient in L/ $\mu$ mol·cm, t die Reaktionszeit in min,  $V_{Probe}$  das Probenvolumen in mL,  $c_{Stamm}$  die Konzentration der Stammlösung in g/mL und VF der Verdünnungsfaktor.

## 3.5 Enzymcharakterisierung

### 3.5.1 Temperatur- und pH-Optimum

Die Temperatur- und pH-Optima der  $\beta$ -Galactosidasen wurden entsprechend der Parameter in Tabelle 3-1 bestimmt. Die pH-Abhängigkeit der Glucose-Oxidase-Aktivität wurde in 50 mmol/L Na-Acetat-Puffer bei 35°C ermittelt, das Temperaturprofil im selben Puffer bei pH 6,5. Für Katalase wurde nur die Temperaturabhängigkeit in 50 mmol/L K-Phosphat-Puffer bei pH 7,0 im Bereich von 25–55°C untersucht. Hierfür wurde ein temperierbares Photometer (Evolution™ 201, Thermo Scientific) eingesetzt.

**Tabelle 3-1:** Parameter zur Bestimmung von Temperatur- und pH-Optimum der  $\beta$ -Galactosidasen.

Enzymquelle	oNPG-Konz. [mmol/L]	Bedingungen für pH- Abhängigkeit	Bedingungen für Temperatur-Abhängigkeit
<i>A. oryzae</i>	22	-	50 mmol/L Na-Acetat pH 4,5
<i>K. lactis</i>	8,3	-	50 mmol/L PEM <sup>a</sup> pH 6,5
<i>Lactobacillus</i> sp.	22	50 mmol/L McIlvaine <sup>b</sup> , 30°C	50 mmol/L McIlvaine pH 7,0
<i>C. laurentii</i>	20	50 mmol/L McIlvaine (pH 3–8) 50 mmol/L Borax <sup>c</sup> (pH 8–11), 50°C	50 mmol/L McIlvaine pH 4,5, pH 6,5 und pH 8,0

<sup>a</sup> PEM-Puffer nach FCC-Methode [64]: 50 mmol/L  $KH_2PO_4/K_2HPO_4$  mit 1  $\mu$ mol/L  $MgSO_4$  und 0,056  $\mu$ mol/L EDTA. <sup>b</sup> aus 50 mmol/L  $Na_2HPO_4$  und 50 mmol/L Citronensäure. <sup>c</sup> aus 50 mmol/L  $Na_2B_4O_7$  und 50 mmol/L NaOH bzw. 50 mmol/L HCl.

### 3.5.2 Bestimmung von Aktivatoren und Inhibitoren

Der Einfluss mono- und divalenter Kationen ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , jeweils als Chlorid-Salz) sowie der Hydrolyseprodukte Glucose und Galactose auf die oNPG-Aktivität wurde bei Konzentrationen von 1, 10 und 100 mmol/L untersucht. Die jeweiligen Assay-Parameter sind Tabelle 3-2 zu entnehmen.

**Tabelle 3-2:** Parameter zur Bestimmung der  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität bei Anwesenheit verschiedener Effektoren.

Enzymquelle	Assay-Parameter
<i>A. oryzae</i>	22 mmol/L oNPG in 50 mmol/L Na-Acetat pH 4,5, 55°C
<i>K. lactis</i>	22 mmol/L oNPG in 50 mmol/L BisTris/HCl mit 1 mmol/L $\text{MgCl}_2$ pH 6,5, 45°C
<i>Lactobacillus</i> sp.	22 mmol/L oNPG in 50 mmol/L BisTris/HCl pH 6,5, 50°C
<i>C. laurentii</i>	33 mmol/L oNPG in 50 mmol/L BisTris/HCl pH 6,5, 50°C

Die ermittelten Messwerte wurden als relative Aktivität bezogen auf die  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität ohne Effektor ausgedrückt. Da die Lactase aus *K. lactis* in reinem BisTris/HCl-Puffer keine Aktivität zeigte, wurden alle Versuche bei Anwesenheit von 1 mmol/L Magnesium (in Form von  $\text{MgCl}_2$ ) durchgeführt. Die Ergebnisse für *K. lactis* stellen somit genau genommen Wechselwirkungseffekte mit  $\text{Mg}^{2+}$  dar. Gleiches gilt für  $\text{Na}^+$ -Ionen bei *A. oryzae* aufgrund des verwendeten Na-Acetat-Puffers.

### 3.5.3 Enzymstabilität

Die Bestimmung der Enzymstabilität erfolgte in Puffer bei Abwesenheit von Substrat bzw. in Molke (d. h. bei Anwesenheit des Substrates Lactose). Hierfür wurden die Enzyme verschiedenen Temperaturen (Thermomixer) ausgesetzt. Zu bestimmten Zeiten wurde eine Probe entnommen und 5 min im Eiswasserbad gekühlt. Anschließend wurde die restliche Enzymaktivität mittels oNPG-Assay gemessen. Die Inaktivierung wurde mittels einer Reaktion 1. Ordnung beschrieben [320]:

$$c_t = c_0 \cdot e^{-k_d \cdot t} \quad (3)$$

Somit lässt sich aus der Auftragung des natürlichen Logarithmus der auf die Ausgangsaktivität  $c_0$  bezogenen Restaktivität  $c_t$  zum Zeitpunkt  $t$  gegen die Zeit, die Geschwindigkeitskonstante der Deaktivierung  $k_d$  ermitteln. Die Berechnung der Halbwertszeit  $t_{1/2}$  bei  $c_t = c_0/2$  erfolgte über:

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k_d} \quad (4)$$

Die Temperaturabhängigkeit von  $k_d$  wurde mittels Arrhenius-Diagramm entsprechend folgender Gleichung analysiert (Linearisierung der Arrhenius-Gleichung durch Auftragung von  $\ln(k_d)$  gegen  $1/T$ ):

$$\ln(k_d) = \ln(k_0) - \frac{E_d}{R} \cdot \frac{1}{T} \quad (5)$$



Hierbei sind  $E_d$  die Deaktivierungsenergie,  $k_0$  der Häufigkeitsfaktor und  $R$  die universelle Gaskonstante.

### 3.6 Galactooligosaccharid-Synthese

#### 3.6.1 Verwendung von kommerziellen $\beta$ -Galactosidasen

Süß- und Sauermolkenpulver wurden in Wasser gelöst, sodass sich folgende Lactosekonzentrationen ergaben: 38 g/L, 100 g/L, 200 g/L und 300 g/L (genaue Zahlenwerte siehe Tabelle A.7-8). Zum Vergleich wurde die Synthese in Wasser (*A. oryzae*) bzw. PEM-Puffer (*K. lactis*) bei gleichen Lactosekonzentrationen durchgeführt. Der pH-Wert wurde vor der Reaktion auf 4,5 (*A. oryzae*) bzw. 6,5 (*K. lactis*) eingestellt. Als Reaktionstemperatur wurden 55°C (*A. oryzae*) bzw. 45°C (*K. lactis*) gewählt. Die Synthese erfolgte in 300 mL Erlenmeyer-Kolben (Füllvolumen: 100 mL) in einem Schüttel-Wasserbad (Model 1092, GFL - Gesellschaft für Labortechnik mbH) bei 100 1/min und wurde durch die Zugabe von 0,5 mL Enzymlösung gestartet. Das Enzym/Substrat-Verhältnis betrug jeweils 50  $U_{\text{ONPG}}/\text{g}_{\text{Lactose}}$ . (Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte entsprechend der Syntheseparameter.) Zu definierten Zeiten wurden Proben (1,5 mL) entnommen und für 10 min bei 95°C in einem Thermomixer erhitzt, um die  $\beta$ -Galactosidase zu inaktivieren.

Die *A. oryzae*- $\beta$ -Galactosidase wurde zusätzlich auch in Caseinmolke, Griechischer Joghurt-Molke und einem konzentrierten Sauermolkenpermeat eingesetzt. Der pH-Wert wurde hierbei nicht angepasst (Bereich 4,2–4,6). Die Reaktion fand in einem Thermomixer mit 1,5 mL Reaktionsgefäßen (1 mL Molke plus 36–205  $\mu\text{L}$  Enzymlösung zur Einstellung eines E/S-Verhältnisses von 50 U/g) bei 55°C statt.

#### 3.6.2 Verwendung von $\beta$ -Galactosidase aus *Lactobacillus bulgaricus* LB4

Basierend auf den Ergebnissen der Enzymcharakterisierung wurde die  $\beta$ -Galactosidase aus *L. bulgaricus* LB4 für die Untersuchungen zur GOS-Synthese ausgewählt. Aus der Bestimmung der Enzymaktivität (22 mmol/L oNPG in 50 mmol/L Na-Phosphat-Puffer pH 6,5) bei den Synthesetemperaturen 10°C, 20°C, 30°C, 40°C und 50°C wurde das benötigte Volumen an Enzymlösung zur Einstellung eines E/S-Verhältnisses von 30 U/g ermittelt. Die daraus resultierende Verdünnung der Substratlösung wurde bei der Einwaage von Lactose (in 50 mmol/L Na-Phosphat-Puffer pH 6,5) bzw. Süßmolkenpulver (von Milchwerke "Mittelelbe" GmbH in deion. Wasser) berücksichtigt, sodass sich immer eine finale Konzentration von 45 g/L Lactose ergab. Dies entspricht einer Trockenmasse der Molke von ca. 57 g/L. Der pH-Wert der Molke wurde vor dem Versuch auf pH 6,5 eingestellt (ursprünglicher pH-Wert ca. 6,4). Die GOS-Analytik erfolgte nur auf der Hi-Plex Na-Säule.

#### 3.6.3 Verwendung von *Cryptococcus laurentii*-Zellen

Neben dem Einfluss der anfänglichen Lactosekonzentration (40 g/L, 100 g/L und 200 g/L in 50 mmol/L McIlvaine-Puffer pH 4,5), wurde die GOS-Synthese in verschiedenen Sauermolken (Caseinmolke, Griechische Joghurt-Molke, konzentriertes Sauermolkenpermeat) bei ihrem natürlichen pH-Wert (4,2–4,6) untersucht. Für die Synthesen in Puffer wurde die Verdünnung durch die Zelllösung (40  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{L}$  bzw. 200  $\mu\text{L}$  stammend aus einer 96-stündigen Kultivierung, Gesamtvolumen jeweils 1 mL) berücksichtigt und die Substratlösung entsprechend konzentrierter angesetzt, sodass sich die genannten Anfangskonzentrationen ergaben. Für die Versuche mit

Sauermolke wurde jeweils 1 mL Lösung vorgelegt und entsprechend der jeweiligen Lactosekonzentration (37–209 g/L) ein bestimmtes Volumen an Zellsuspension (36–205 µL) zur Einstellung eines E/S-Verhältnisses (Aktivität gemessen mit 65 mmol/L oNPG, 50 mmol/L Mcllvaine-Puffer pH 4,5, 55°C) von 0,94 U/g hinzugefügt. Demnach betrug die tatsächliche Anfangslactosekonzentration in den Molkeproben 35,3–173,4 g/L. Die GOS-Analytik wurde in der Regel nur auf der Hi-Plex Na-Säule durchgeführt.

### 3.6.4 Kopplung mit Glucose-Oxidase und Katalase

Die Synthese fand in einem BioStat B-Fermentor (1 L-Gefäß, Arbeitsvolumen 0,5 L, Sartorius Stedim Systems GmbH) statt. Lactose (200 g/L) wurde im jeweiligen Puffer (50 mmol/L Na-Acetat pH 4,5 bzw. 50 mmol/L PEM pH 6,5 für die Kombination mit Maxilact A4 (aus *A. oryzae*) bzw. optilactase LX2 (aus *K. lactis*)) gelöst. Folgende E/S-Verhältnisse wurden eingestellt: 50 U/g für Maxilact A4, 25 U/g für optilactase LX2, 190 U/g für Glucose-Oxidase und 500 U/g für Katalase. Glucose-Oxidase wurde direkt vor der Zugabe in 5 mL Puffer gelöst und komplett in den Reaktionsansatz gegeben. Von den entsprechend verdünnten  $\beta$ -Galactosidasen wurden 2 mL hinzu gegeben, Katalase wurde direkt hinzu pipettiert. Bei der Kopplung mit Maxilact A4 wurde nach 4 h erneut Katalase hinzu gegeben. Die Reaktionstemperatur betrug 25°C, um eine ausreichende Stabilität aller Enzyme gewährleisten zu können. Der Sauerstoffeintrag wurde über einen Ring-Sparger (1 L/min Luft) und eine Rührerdrehzahl von 800 1/min realisiert. Vor Zugabe der Enzyme wurde das System mind. 30 min equilibriert. Gelöstsauerstoff und pH-Wert wurden mit Hilfe der Software BioPAT® MFCS aufgezeichnet. Der pH-Wert wurde mittels automatischer Dosierung einer 40 %-igen (w/w)  $\text{CaCO}_3$ -Lösung konstant gehalten. Die maximale Basezugabe lag bei 24 mL (*A. oryzae*) bzw. 95 mL (*K. lactis*). Die dadurch verursachte Verdünnung der Reaktionslösung wurde bei der Angabe der Konzentrationen berücksichtigt. In bestimmten Zeitabständen wurden Proben von 3 mL entnommen und zur Inaktivierung der Enzyme auf 95°C für 5 min im Thermomixer erhitzt. Ein Referenzversuch (ohne Zugabe von Glucose-Oxidase, Katalase und  $\text{CaCO}_3$ ) wurde unter ansonsten exakt gleichen Bedingungen durchgeführt. GOS-Disaccharide (Säule: Zorbax Carbohydrate, 250 mm x 4,6 mm, Agilent Technologies) wurden nur für die Versuche mit *K. lactis* bestimmt.

### 3.6.5 Kopplung mehrerer $\beta$ -Galactosidasen

Für die Untersuchungen zur Kombination mehrerer  $\beta$ -Galactosidasen bei der GOS-Synthese wurden zwei verschiedene Ansätze getestet. Zum einen wurden Enzyme aus *A. oryzae* (Maxilact A4) und *K. lactis* (optilactase LX2) kombiniert, zum anderen *A. oryzae* (Maxilact A4) und *C. laurentii*-Zellen, wobei die Synthese jeweils sequentiell oder parallel erfolgte. Die Anfangslactosekonzentration betrug in allen Fällen 200 g/L. Die einzusetzenden Enzymmengen wurden auf diese Konzentration bezogen. Die kommerziellen Enzympräparate wurden mit einem E/S von 50 U/g eingesetzt, die Experimente mit *C. laurentii* wurden aufgrund der geringeren Enzymkonzentration bei 1 U/g durchgeführt. Bei der parallelen Prozessführung wurden die Enzyme jeweils im Verhältnis 1:1 eingesetzt. Für *K. lactis* wurde die Synthese in PEM-Puffer bei pH 6,5 und 45°C durchgeführt, für *A. oryzae* in PEM-Puffer pH 6,5 bzw. 4,5 bei 55°C. Alle Kombinationen *A. oryzae*/*C. laurentii* fanden in 50 mmol/L Mcllvaine-Puffer bei pH 4,5 und 55°C statt. Bei Angabe der GOS-Ausbeute wurde der

Anteil der GOS-Disaccharide an den Gesamtdisacchariden durch eine zusätzliche Trennung auf einer Aminophase berücksichtigt.

### 3.7 Galactooligosaccharid-Analytik

Die Analytik der Galactooligosaccharide wurde mittels HPLC (System: LaChrom Elite von VWR International GmbH) realisiert. Die Zucker wurden auf der Hi-Plex Na-Säule (300 mm x 7,7 mm, Agilent Technologies) bei einer Ofentemperatur von 80°C und einem Fluss von 0,3 mL/min (Eluent: 0,2 % Natriumazid in Wasser) getrennt. Das Injektionsvolumen betrug 20 µL. Die Quantifizierung erfolgte mittels RI-Detektor und einer externen Standard-Kalibrierung der Zucker Glucose, Galactose, Lactose (für Lactose und GOS-Disaccharide), Raffinose (für GOS-Trisaccharide) und (teilweise) Maltotetraose (für GOS-Tetrasaccharide und höhere GOS). Die Proben wurden entsprechend verdünnt (inkl. Carrez-Fällung) und durch einen 0,22 µm PES-Spritzenvorsatzfilter (Carl Roth GmbH) filtriert.

Sofern nicht anders angegeben, wurden die GOS-Disaccharide zusätzlich auf einer Amino-Phase (Zorbax Carbohydrate (250 mm x 4,6 mm, Agilent Technologies) mit 75:25 Acetonitril:Wasser, 1,4 mL/min, 35°C oder Microsorb-MV 100 NH<sub>2</sub> (250 mm x 4,6 mm, Vorsäule: Polaris 5 NH<sub>2</sub> MetaGuard, Agilent Technologies) mit 70:30 Acetonitril:Wasser, 1,3 mL/min, 40°C) von Lactose getrennt. Mit beiden Säulen wurde ein ähnliches Trennergebnis (siehe Abbildung A.7-8) erhalten, sodass die Säulen äquivalent verwendet werden konnten. Über das Peakflächenverhältnis konnte so der Anteil von Lactose an den Gesamtdisacchariden (erhalten aus der Analytik auf der Hi-Plex Na-Säule) bestimmt und folglich der Anteil an GOS-Disacchariden ausgelobt werden. Erfolgte die Analytik nur auf der Hi-Plex Na-Säule, so wurden Disaccharide, welche auf dieser Säule von Lactose getrennt eluieren, in die Berechnung der Ausbeute einbezogen. Die reale Ausbeute kann jedoch durch eventuell weitere Disaccharide höher liegen.

Die GOS-Ausbeute ( $Y_{GOS}$ ) wird in der Regel als prozentualer Anteil am Gesamtzucker angegeben:

$$Y_{GOS}[\%] = \frac{c_{GOS}[g/L]}{c_{ges}[g/L]} \cdot 100\% = \frac{(c_{DP2}+c_{DP3}+c_{DP4}+c_{DP5})[g/L]}{(c_{Gal}+c_{Glc}+c_{Lac}+c_{GOS})[g/L]} \cdot 100\% \quad (6)$$

Bei den Synthesen mit galactosehaltigen Molken sowie bei den Versuchen mit parallelem Glucose-Umsatz durch GOX/KAT, wurde die Ausbeute auf die Ausgangslactosekonzentration (ILC) bezogen:

$$Y_{GOS}[\%] = \frac{c_{GOS}[g/L]}{c_{ILC}[g/L]} \cdot 100\% \quad (7)$$

Der Lactosehydrolysegrad ist definiert als Anteil umgesetzter Lactose im Verhältnis zum Ausgangslactosegehalt (jeweils in % des Gesamtzuckers):

$$DH_{Lac}[\%] = 100\% - \frac{c_{Lac}[\%]}{c_{ILC}[\%]} \cdot 100\% \quad (8)$$

Die spezifische Produktivität wurde als auf die Reaktionszeit bezogene enzymatische Produktivität  $\pi_{E,t}$  zum Zeitpunkt der maximalen GOS-Ausbeute ( $Y_{GOS}$ ) ausgedrückt:

$$\pi_{E,t}[mgGOS/U \cdot h] = \frac{Y_{GOS}[mg/L]}{E/S[U/g] \cdot c_{ILC}[g/L] \cdot t[h]} \quad (9)$$

### 3.8 Statistische Auswertung

Zur Analyse signifikanter Unterschiede wurde eine Varianzanalyse (ANOVA, engl. *analysis of variance*) mit nachgeschaltetem Tukey-Kramer-Post-hoc-Test auf einem Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$  durchgeführt. Die CLD-Darstellung (engl. *compact letter display*) erfolgte mit Hilfe der Software von Assaad et al. [321].

## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Zusammensetzung der Molken

In Tabelle 4-1 und Tabelle 4-2 ist die Zusammensetzung der für die GOS-Synthese verwendeten Süß- und Sauermolken dargestellt.

**Tabelle 4-1:** Zusammensetzung der verwendeten Süßmolken\*, n. d. = nicht detektiert.

	Süßmolke 1 <sup>a</sup>	Süßmolke 2 <sup>b</sup>
pH [-]	6,21	6,39
Trockenmasse <sup>c</sup> [g/L]	49,79 <sup>b</sup> ± 0,86	57,08 <sup>a</sup> ± 0,30
Gesamtzucker [g/L]	38,72 <sup>b</sup> ± 0,75	45,08 <sup>a</sup> ± 0,25
Glucose [g/L]	0,30 <sup>a</sup> ± 0,02	n. d. <sup>b</sup>
Galactose [g/L]	0,43 <sup>a</sup> ± 0,05	0,08 <sup>b</sup> ± 0,01
Lactose [g/L]	38,00 <sup>b</sup> ± 0,68	45,00 <sup>a</sup> ± 0,24
Gesamtprotein <sup>d</sup> [g/L]	5,56 <sup>b</sup> ± 0,08	6,18 <sup>a</sup> ± 0,02
NPN [g/L]	0,71 <sup>a</sup> ± 0,02	0,71 <sup>a</sup> ± 0,02
Asche [g/L]	4,33 <sup>b</sup> ± 0,01	4,46 <sup>a</sup> ± 0,01
Milchsäure [g/L]	0,58 <sup>a</sup> ± 0,01	0,41 <sup>b</sup> ± 0,01
Fett [g/L]	0,47 <sup>b</sup> ± 0,01	0,65 <sup>a</sup>
Na <sup>+</sup> [mmol/L]	16,51 <sup>a</sup> ± 0,35	14,56 <sup>b</sup> ± 0,26
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> [mmol/L]	2,41 <sup>a</sup> ± 0,05	n. d. <sup>b</sup>
K <sup>+</sup> [mmol/L]	29,64 <sup>b</sup> ± 0,95	34,28 <sup>a</sup> ± 0,59
Mg <sup>2+</sup> [mmol/L]	2,81 <sup>a</sup> ± 0,09	2,60 <sup>a</sup> ± 0,12
Ca <sup>2+</sup> [mmol/L]	8,44 <sup>a</sup> ± 0,22	6,15 <sup>b</sup> ± 0,26
Cl <sup>-</sup> [mmol/L]	21,48 <sup>a</sup> ± 0,53	22,84 <sup>a</sup> ± 0,69
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> [mmol/L]	0,81 <sup>a</sup> ± 0,04	0,56 <sup>b</sup> ± 0,03
PO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> [mmol/L]	8,35 <sup>a</sup> ± 0,19	8,25 <sup>a</sup> ± 0,21
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> [mmol/L]	1,14 <sup>a</sup> ± 0,18	1,28 <sup>a</sup> ± 0,15

<sup>a</sup> rekonstituiert aus Pulver von Molkerei Meggle Wasserburg GmbH & Co. KG (Wasserburg), n = 3. <sup>b</sup> rekonstituiert aus Pulver von Milchwerke "Mittellelbe" GmbH (Stendal), n = 2-3. <sup>c</sup> berechnet aus Gesamtzucker, Reinprotein, NPN, Asche und Fett. <sup>d</sup> Reinprotein nach Kjeldahl. Angaben ohne Standardabweichung: n = 1. \* Werte in einer Zeile mit unterschiedlichem Exponent unterscheiden sich signifikant (Tukey-Kramer-Test, α = 0,05). Teile der Tabelle sind Bestandteil von Tab. 1 in [CF4].

Das bereitgestellte Sauermolkenpermeat-Konzentrat ist unbekannten Ursprungs, enthält jedoch mit knapp 10 % der Trockenmasse unerwartet viel Protein. Ebenso wurden ca. 43 g/L Galactose detektiert, was auf eine Behandlung mit Mikroorganismen hindeutet. Analog enthält die aus der Griechischen Joghurt-Herstellung stammende Abtropfmolke weniger Lactose als Caseinmolke, dafür aber ca. 9,6 g/L Galactose aufgrund der Aktivität der Starterkulturen. Auch der Proteingehalt ist vermindert, Unterschiede in der Mineralienzusammensetzung gibt es jedoch nicht.

**Tabelle 4-2:** Zusammensetzung der verwendeten Sauermolken\*, n. d. = nicht detektiert, n. b. = nicht bestimmt.

	rek. Sauermolke <sup>a</sup>	Caseinmolke <sup>b</sup>	GJ-Molke <sup>c</sup>	konz. SMP <sup>d</sup>
pH [-]	4,40	4,57	4,27	4,19
Trockenmasse <sup>e</sup> [g/L]	51,35 <sup>b</sup> ± 1,27	> 62,26 <sup>b</sup> ± 3,29	> 56,22 <sup>b</sup> ± 1,99	> 330,23 <sup>a</sup> ± 8,16
Gesamtzucker <sup>f</sup> [g/L]	39,10 <sup>b</sup> ± 1,17	51,38 <sup>b</sup> ± 2,79	45,85 <sup>b</sup> ± 1,73	251,39 <sup>a</sup> ± 7,57
Glucose [g/L]	n. d. <sup>b</sup>	n. d. <sup>b</sup>	0,01 <sup>b</sup> ± 0,01	0,35 <sup>a</sup> ± 0,04
Galactose [g/L]	1,10 <sup>c</sup> ± 0,09	n. d. <sup>c</sup>	9,21 <sup>b</sup> ± 0,35	42,52 <sup>a</sup> ± 0,52
Lactose [g/L]	38,00 <sup>c</sup> ± 1,08	51,38 <sup>b</sup> ± 2,79	36,55 <sup>c</sup> ± 1,36	208,52 <sup>a</sup> ± 7,01
Gesamtprotein <sup>g</sup> [g/L]	3,02 <sup>b</sup> ± 0,03	1,87 <sup>c</sup> ± 0,33	1,18 <sup>d</sup> ± 0,12	32,50 <sup>a</sup> ± 0,16
NPN [g/L]	1,63 <sup>b</sup> ± 0,05	1,10 <sup>b</sup> ± 0,01	1,20 <sup>b</sup> ± 0,04	5,27 <sup>a</sup> ± 0,40
Asche [g/L]	7,42 <sup>c</sup> ± 0,01	7,91 <sup>b</sup> ± 0,16	7,99 <sup>b</sup> ± 0,10	41,07 <sup>a</sup> ± 0,03
Milchsäure [g/L]	8,11 <sup>c</sup> ± 0,08	6,71 <sup>c</sup> ± 0,10	10,67 <sup>b</sup> ± 0,07	47,62 <sup>a</sup> ± 1,09
Fett [g/L]	0,18 ± 0,01	n. b.	n. b.	n. b.
Na <sup>+</sup> [mmol/L]	18,57 <sup>b</sup> ± 0,25	17,91 <sup>b</sup>	18,45 <sup>b</sup>	94,19 <sup>a</sup>
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> [mmol/L]	10,35 <sup>b</sup> ± 0,25	n. d. <sup>d</sup>	5,78 <sup>c</sup>	18,15 <sup>a</sup>
K <sup>+</sup> [mmol/L]	45,20 <sup>b</sup> ± 0,59	47,04 <sup>b</sup>	47,20 <sup>b</sup>	247,81 <sup>a</sup>
Mg <sup>2+</sup> [mmol/L]	4,90 <sup>b</sup> ± 0,09	4,91 <sup>b</sup>	4,79 <sup>b</sup>	25,40 <sup>a</sup>
Ca <sup>2+</sup> [mmol/L]	25,46 <sup>c</sup> ± 0,70	31,44 <sup>bc</sup>	33,00 <sup>b</sup>	150,81 <sup>a</sup>
Cl <sup>-</sup> [mmol/L]	42,57 <sup>b</sup> ± 0,56	25,17 <sup>c</sup> ± 0,47	25,60 <sup>c</sup> ± 0,03	145,39 <sup>a</sup> ± 2,05
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> [mmol/L]	0,33 <sup>b</sup> ± 0,02	0,59 <sup>b</sup> ± 0,17	0,67 <sup>b</sup> ± 0,13	3,61 <sup>a</sup> ± 0,48
PO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> [mmol/L]	17,58 <sup>c</sup> ± 0,37	22,43 <sup>b</sup> ± 0,72	21,60 <sup>b</sup> ± 0,56	117,39 <sup>a</sup> ± 1,29
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> [mmol/L]	0,64 <sup>b</sup> ± 0,02	1,20 <sup>b</sup> ± 0,24	1,21 <sup>b</sup> ± 0,07	7,68 <sup>a</sup> ± 2,12

<sup>a</sup> rekonstituiert aus Pulver von Euroduna Food Ingredients GmbH (Barmstedt), n ≥ 3. <sup>b</sup> Milchsäure-Fällung auf pH 4,6, n ≥ 2. <sup>c</sup> Griechische Joghurt-Molke, n ≥ 2. <sup>d</sup> konzentriertes Sauermolkenpermeat von Arla Foods Deutschland GmbH, n ≥ 2. <sup>e</sup> berechnet aus Gesamtzucker, Reinprotein, NPN, Asche und Fett. <sup>f</sup> bei GJ-Molke: inklusive Spuren (0,08 g/L) eines Tri-saccharids. <sup>g</sup> Reinprotein nach Kjeldahl. Angaben ohne Standardabweichung: n = 1. \* Werte in einer Zeile mit unterschiedlichem Exponent unterscheiden sich signifikant (Tukey-Kramer-Test, α = 0,05). Teile der Tabelle sind Bestandteil von Tab. 1 in [CF4] und Tab. 2 in [CF1].

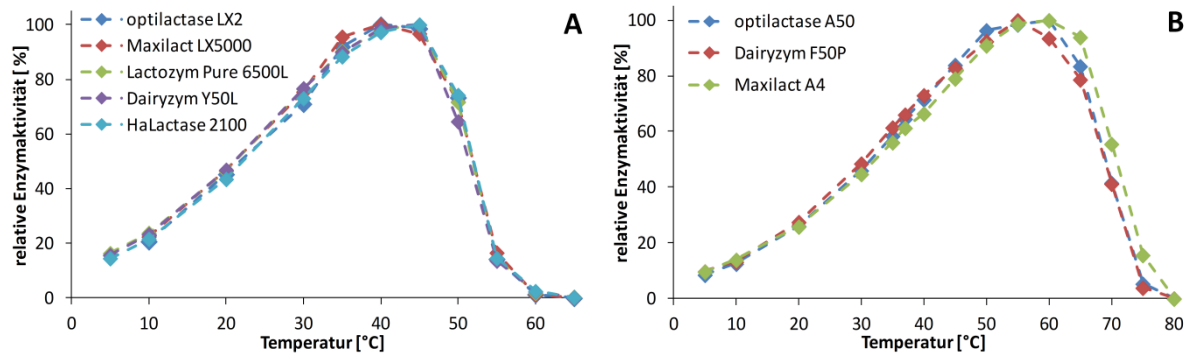
## 4.2 Charakterisierung der β-Galactosidasen

### 4.2.1 Temperatur- und pH-Optimum

Die Bestimmung des Temperatur- als auch pH-Optimums erfolgte für alle β-Galactosidasen mit Hilfe des Substrates oNPG. Für die kommerziellen Enzympräparate aus *A. oryzae* und *K. lactis* wurde die Temperaturabhängigkeit bei pH 4,5 bzw. pH 6,5 ermittelt, was sowohl dem jeweiligen pH-Optimum (laut Herstellerangaben) als auch den pH-Werten der Applikationsmedien Sauer- bzw. Süßmolke entspricht.

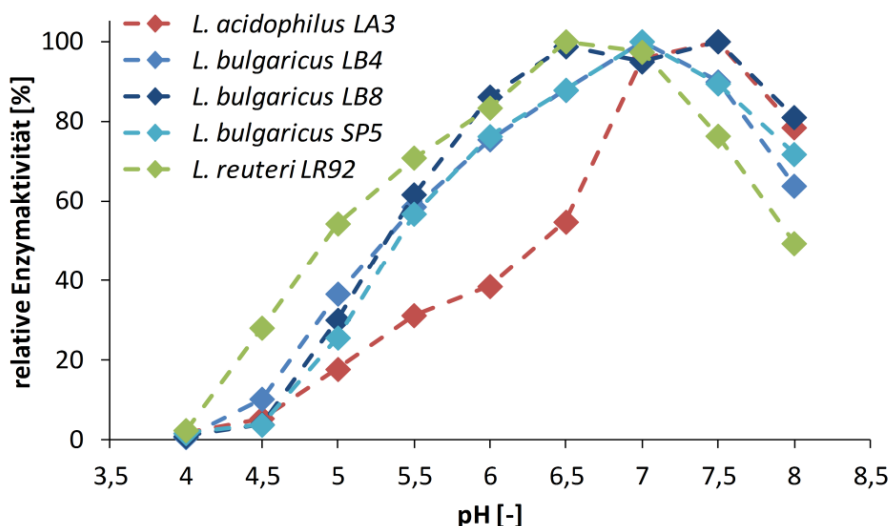
Trotz leichter Unterschiede in der absoluten Enzymaktivität (siehe Abbildung A.7-9) besteht kein Unterschied hinsichtlich der relativen Temperaturabhängigkeit (Abbildung 4-1A) der fünf aus *K. lactis*

gewonnenen  $\beta$ -Galactosidase-Präparate. Es ist daher davon auszugehen, dass sich die bei der Produktion eingesetzten Mikroorganismenstämme nicht unterscheiden bzw. eine hohe Sequenzhomologie zwischen den Enzymen besteht. Das Optimum liegt bei 40–45°C, was den Herstellerangaben entspricht (siehe auch Tabelle 2-6).



**Abbildung 4-1:** Temperaturoptimum von  $\beta$ -Galactosidase-Präparaten aus *K. lactis* (A) und *A. oryzae* (B) von verschiedenen Herstellern. Assaybedingungen: *K. lactis*: 8,3 mmol/L oNPG in PEM-Puffer pH 6,5, n = 3, *A. oryzae*: 22 mmol/L oNPG in Na-Acetat-Puffer pH 4,5, n = 3.

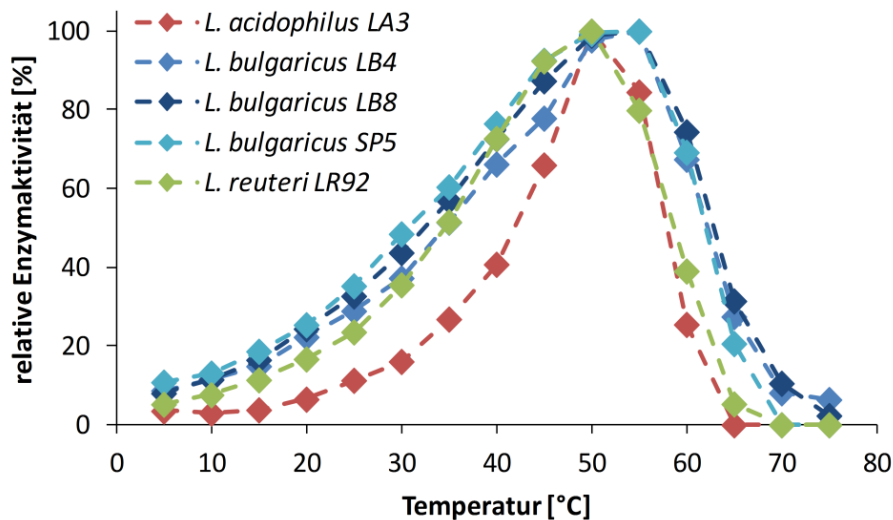
Die drei Enzympräparate aus *A. oryzae* unterscheiden sich ebenfalls nur geringfügig hinsichtlich ihrer relativen Temperaturabhängigkeit (Abbildung 4-1B, für Absolutwerte siehe Abbildung A.7-10). Die maximale Enzymaktivität wird bei 55°C (Dairyzym F50P) bzw. 55–60°C (optilactase A50 und Maxilact A4) erreicht, womit  $\beta$ -Galactosidasen aus *A. oryzae* generell etwas thermophiler als  $\beta$ -Galactosidasen aus *K. lactis* sind.



**Abbildung 4-2:** pH-Optimum von  $\beta$ -Galactosidasen aus *Lactobacillus* sp. (Rohextrakte). Assaybedingungen: 22 mmol/L oNPG in 50 mmol/L Na-Citrat-Puffer, T = 30°C, n = 2.

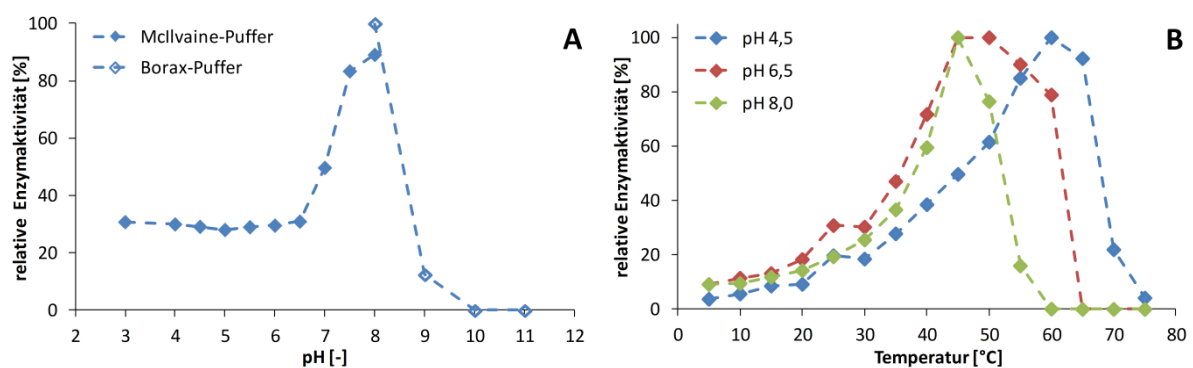
Alle  $\beta$ -Galactosidasen der untersuchten *Lactobacillus*-Stämme besitzen ihre maximale Enzymaktivität im neutralen Milieu bei pH 7,0 (Abbildung 4-2). Die Lactase aus *L. acidophilus* zeigt mit einem Aktivitätsverlust von ca. 45 % bei pH 6,5 die stärkste Abhängigkeit vom pH-Wert. Die  $\beta$ -Galactosidasen der Stämme LB4 und SP5 aus *L. bulgaricus* weisen die größte Ähnlichkeit auf, was auf eine hohe Sequenzhomologie hindeutet. Die breiteste pH-Aktivität im sauren Milieu zeigt *L. reuteri* LR92,

welcher bei pH 4,5 eine relative Aktivität von ca. 28 % aufweist, während alle anderen Enzyme bei diesem pH-Wert nur eine Aktivität von unter 10 % besitzen. Hingegen ist die relative Aktivität im leicht basischen Milieu bei pH 8,0 im Vergleich zu allen anderen Enzymen mit ca. 50 % am geringsten. Die Möglichkeit der Anwendung in Süßmolke ist somit für alle Enzyme prinzipiell gegeben. Vor der Zugabe zu Sauermolke sollte jedoch eine pH-Wert-Anpassung erfolgen.



**Abbildung 4-3:** Temperaturoptimum von β-Galactosidasen aus *Lactobacillus* sp. (Rohextrakte). Assaybedingungen: 22 mmol/L oNPG in 50 mmol/L Na-Citrat-Puffer pH 7,0, n = 2.

Das Temperaturoptimum der *Lactobacillus*-Lactasen wurde bei 50°C ermittelt (Abbildung 4-3), wobei alle *L. bulgaricus*-Lactasen (LB4, LB8, SP5) ein breiteres Optimum von bis zu 55°C aufweisen und somit auch thermostabiler sind (vgl. Aktivität bei 60°C). Ähnlich wie beim pH-Wert, hat auch die Temperatur bei *L. acidophilus* den größten Einfluss auf die Enzymaktivität (vgl. Temperaturbereich 20–45°C).



**Abbildung 4-4:** pH- (A, bei 50°C) und Temperaturoptimum (B, in 50 mmol/L Mcllvaine-Puffer) der *C. laurentii*-Zellen. Substrat: 20 mmol/L oNPG im jeweiligen Puffer, n = 2. Abbildung publiziert als Fig. 1 in [CF1].

Entgegen der Literaturangaben für ein aufgereinigtes Enzym aus *C. laurentii* OKN-4 [65], liegt die höchste oNPG-Aktivität der *C. laurentii*-Zellen des Stamms DSM 27153 nicht im sauren, sondern im leicht basischen pH-Milieu mit einem Optimum bei pH 8,0 (Abbildung 4-4A). Neben stammspezifischen Unterschieden wird vor allem vermutet, dass die Form (zellwandgebunden vs. aufgereinigt)



diese Unterschiede bedingt. Es ist denkbar, dass die umgebende Zellwand das Enzym in seiner Konformation und damit auch Stabilität gegenüber Umweltbedingungen beeinflusst. Zu bemerken ist, dass die Enzymaktivität zwischen pH 3,0 und 6,5 auf einem konstanten Niveau von ca. 30 % bleibt, während das freie Enzym in diesem Bereich eine starke Abhängigkeit zeigte mit einem Optimum bei pH 4,5 und nur noch ca. 30 % Restaktivität bei pH 6,5 [65].

Anhand der Temperaturabhängigkeit, welche bei drei verschiedenen pH-Werten (entsprechend Süß- und Sauermolke sowie dem pH-Optimum) aufgenommen wurde, lässt sich bereits erkennen, dass dieser die Enzymstabilität bei Temperaturen über 45°C maßgeblich beeinflusst (Abbildung 4-4B). Mit abnehmendem pH-Wert verschiebt sich das Optimum zu höheren Temperaturen. Bei pH 4,5 ergab sich somit eine optimale Aktivität bei 60°C, was sich mit Literaturangaben für das aufgereinigte Enzym bei pH 5,0 deckt [65]. Hingegen ist das Enzym bei pH 8,0 bei 60°C bereits vollständig inaktiviert. Die geplante Applikation des *C. laurentii*-Enzyms in Sauermolke ist trotz der aufgezeigten Differenzen zu den Literaturwerten gegeben.

#### 4.2.2 Inhibitoren und Aktivatoren

Tabelle 4-3 gibt einen Überblick über den prinzipiellen Einfluss verschiedener mono- und divalenter Kationen sowie der Hydrolyseprodukte Glucose und Galactose auf die oNPG-Aktivität der untersuchten  $\beta$ -Galactosidasen. Die dazugehörigen Zahlenwerte finden sich in Tabelle A.7-10 und Tabelle A.7-11.

**Tabelle 4-3:** Überblick über den Einfluss von Glucose, Galactose und verschiedener mono- und divalenter Kationen (als Chlorid-Salz) im Bereich 1–100 mmol/L auf die oNPG-Aktivität verschiedener  $\beta$ -Galactosidasen, + = aktivierend, - = inhibierend, o = kein Einfluss, o/+, o/- und -/+ = Einfluss ändert sich mit zunehmender Konzentration.

Enzymquelle	Glucose	Galactose	Na <sup>+</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>
<i>A. oryzae</i> <sup>a</sup>	o/+	-	o	o	o	o	o
<i>K. lactis</i> <sup>b</sup>	o/+	o	+	+	+	o	+
<i>L. acidophilus</i> LA3	o/+	+	+	+	+	-	+
<i>L. bulgaricus</i> LB4	o/+	-	+	+	+	-	+
<i>L. bulgaricus</i> LB8	o/+	o/+	+	+	+	-/+	o
<i>L. bulgaricus</i> SP5	o/+	-	+	+	+	-/+	+
<i>L. reuteri</i> LR92	o	-	+	+	+	+	+
<i>C. laurentii</i> <sup>c</sup>	o/-	o/-	-	-	-	o	-

<sup>a</sup> optilactase A50, in Gegenwart von Na<sup>+</sup>-Ionen. <sup>b</sup> optilactase LX2, in Gegenwart von 1 mmol/L Mg. <sup>c</sup> ganze Zellen.

Glucose beeinflusst bis zu einer Konzentration von 10 mmol/L (entspricht 1,8 g/L) bei keinem der untersuchten Enzyme die oNPG-Aktivität (vgl. Tabelle A.7-11). Bis auf die Enzyme aus *L. reuteri* und *C. laurentii* bewirkt bei den meisten  $\beta$ -Galactosidasen eine höhere Konzentration von 100 mmol/L (18 g/L) einen Anstieg der Enzymaktivität um etwa 10–30 %. Folglich fungiert Glucose für diese Lactasen als Akzeptormolekül, sodass das aktive Zentrum dieser  $\beta$ -Galactosidasen schneller wieder frei wird, wodurch die Reaktionsgeschwindigkeit (Enzymaktivität) steigt [103]. Erwartungsgemäß wirkt

Galactose bei den meisten Enzymen inhibierend auf den oNPG-Umsatz aufgrund der konkurrierenden Wirkung um das aktive Zentrum. Da auch Galactose als Akzeptor genutzt werden kann, kann es jedoch ähnlich wie bei Glucose, ebenfalls zu einer Steigerung der Enzymaktivität kommen, so gefunden bei *L. acidophilus* LA3 und *L. bulgaricus* LB8. Im Fall von *K. lactis* gleichen sich die aktivierende und die inhibierende Wirkung aus, sodass in Summe keine Beeinflussung der oNPG-Aktivität sichtbar wird. Einzig bei *C. laurentii* bewirken beide Monosaccharide ab einer Konzentration von 100 mmol/L eine verringerte Enzymaktivität, wobei Glucose ein stärkerer Inhibitor als Galactose ist (vgl. Tabelle A.7-11).

Die beobachteten Ergebnisse decken sich prinzipiell mit den Untersuchungen von Warmerdam et al. [103], welche mit Glucose stets eine Aktivitätssteigerung und mit Galactose eine Abhängigkeit des Effektes von der Enzymquelle detektierten ( $\beta$ -Galactosidasen aus *A. oryzae*, *K. lactis* und *B. circulans*). Die Anwesenheit von Galactose wirkte sich beispielsweise positiv auf den oNPG-Umsatz der *B. circulans*-Lactase aus, während die Enzyme aus *A. oryzae* und *K. lactis* deutlich gehemmt wurden mit Aktivitätsverlusten von 80–90 % bzw. 50–60 % bei 20 g/L Galactose. Zu bemerken ist, dass im zitierten Paper bei einer oNPG-Konzentration von etwa 6,5 mmol/L gearbeitet wurde, wonach sich bei 20 g/L Galactose ein deutlich niedrigeres molares Substrat/Inhibitor-Verhältnis von ca. 0,06 ergibt, während die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Ergebnisse bei einem molaren oNPG/Galactose-Verhältnis von ca. 0,21 erhalten wurden. Dies erklärt die Unterschiede jedoch nur partiell, da auch bei einer Inhibitorkonzentration von ca. 5,6 g/L (entspricht einem molaren S/I-Verhältnis von 0,21) weitaus höhere Aktivitätsverluste detektiert wurden (für *A. oryzae*: ca. -50 %, für *K. lactis*: ca. -30 %) [103], als dies in der vorliegenden Arbeit der Fall war (für *A. oryzae*: -20 %, für *K. lactis*: -1 %, siehe Tabelle A.7-11). Das Ausmaß der aktivierenden Wirkung von Glucose (für *A. oryzae*: +20 %, für *K. lactis*: +10 %) ist jedoch weitestgehend konform mit den Literaturdaten bei S/I = 0,21 (für *A. oryzae*: ca. +25 %, für *K. lactis*: ca. +5 %). Eine gute Übereinstimmung kann auch für *L. reuteri* gefunden werden, wonach Glucose bis zu einer Konzentration von ca. 160 mmol/L die oNPG-Aktivität nur leicht reduziert (Restaktivität  $\geq 95$  %), während Galactose bei einer Konzentration von 100 mmol/L einen Aktivitätsverlust von ca. 40 % bedingt [66] (eigene Daten: -30 %). Ebenso decken sich die Ergebnisse für *C. laurentii* prinzipiell mit den Literaturdaten, wobei ein direkter Vergleich durch andere Reaktionsbedingungen erschwert ist. Eine Restaktivität bei S/I = 3,3 bzw. S/I = 0,33 von 92 % bzw. 48 % (Glucose) und 98 % bzw. 77 % (Galactose) wird allerdings als konform zu den von Ohtsuka et al. [65] angegebenen Restaktivitäten von 55 % (Glucose) bzw. 92 % (Galactose) bei jeweils S/I = 1 angesehen.

In der Reaktionslösung vorhandene Salze bewirken keine Änderung der Enzymaktivität der *A. oryzae*- $\beta$ -Galactosidase (Tabelle 4-3), was grundsätzlich eine gute Eignung für das Substrat Molke erwarten lässt. Das Enzym aus *K. lactis* wird hingegen stark durch das Vorhandensein verschiedener Kationen beeinflusst, wobei  $K^+$  den größten Effekt zeigt, gefolgt von  $NH_4^+$  und  $Na^+$  (siehe Tabelle A.7-10). Eine Erhöhung der Magnesium-Konzentration um 10 mmol/L resultiert nur in einer verhältnismäßig leichten Enzymaktivierung von ca. 40 %. Die Ergebnisse stimmen mit denen von Flores et al. [90] überein, welche ebenfalls eine aktivierende Wirkung von  $K^+$ ,  $NH_4^+$  und  $Na^+$  auf das *K. lactis*-Enzym (in Form ganzer Zellen) detektierten.

Die *Lactobacillus*-Lactasen reagieren ebenfalls positiv auf die Anwesenheit von  $K^+$ ,  $NH_4^+$  und  $Na^+$ , wobei das Ausmaß der Aktivierung eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit zeigt. Der stärkste Effekt wurde bei *L. bulgaricus* LB8 und SP5 beobachtet (Tabelle A.7-10). Bis auf den Stamm *L. bulgaricus* LB8

beeinflusst  $\text{Mg}^{2+}$  den oNPG-Umsatz ebenfalls positiv, jedoch fällt die Aktivitätssteigerung mit 10–80 % deutlich geringer aus als bei den anderen Kationen. Der Effekt von Calcium ist nicht ganz eindeutig für *L. bulgaricus* LB8 und SP5, beeinflusst die Enzyme generell jedoch nicht wesentlich in ihrer Aktivität. Ein deutlich inhibierender Einfluss wurde für *L. acidophilus* LA3 (65 %-ige Reduktion bei 10 mmol/L) detektiert, was mit Literaturergebnissen übereinstimmt [68]. Eine negative Tendenz konnte auch bei *L. bulgaricus* LB4 (7 %-ige Reduktion bei 10 mmol/L) beobachtet werden. Demgegenüber reagiert die  $\beta$ -Galactosidase aus *L. reuteri* LR92 mit einer leichten Aktivitätssteigerung, was im Widerspruch zu Nguyen et al. [66] steht, welche bereits bei einer Konzentration von 1 mmol/L eine Aktivitätsabnahme von 30 % feststellten.

Die *C. laurentii*- $\beta$ -Galactosidase (in Form ganzer Zellen) reagiert grundsätzlich negativ auf in der Reaktionslösung vorhandene Kationen, wobei  $\text{NH}_4^+$  und  $\text{Mg}^{2+}$  mit 13 % bzw. 17 % Restaktivität bei 100 mmol/L den stärksten Effekt zeigen (Tabelle A.7-10). Calcium beeinflusst das Enzym im untersuchten Konzentrationsbereich hingegen nicht. Diese Ergebnisse sind zum Teil widersprüchlich zu denen von Ohtsuka et al. [65], was durch unterschiedliche Effekorkonzentrationen (0,5 mmol/L vs. 1–100 mmol/L) erklärt werden kann.

#### 4.2.3 Stabilität in Puffer und Molke

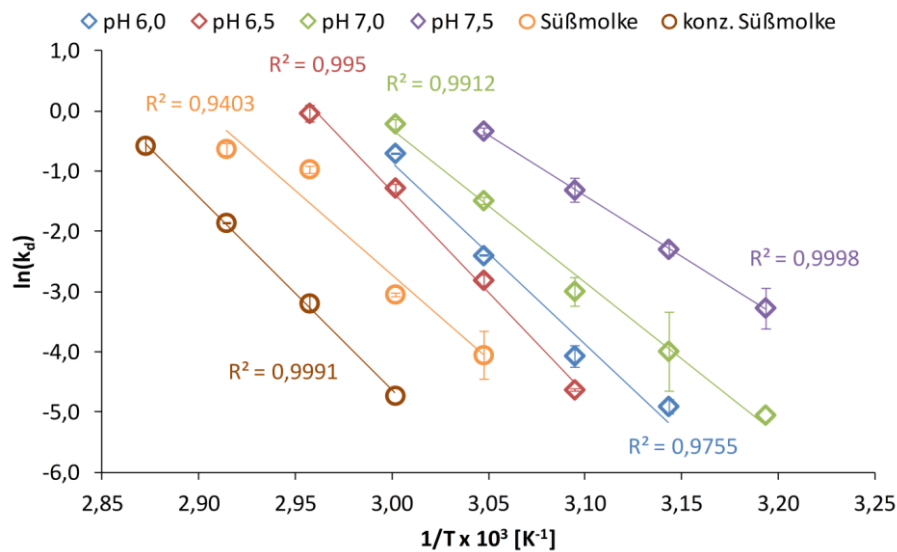
Zur weiteren Charakterisierung der Enzyme wurde die Stabilität in Puffer und Süß- bzw. Sauermolke bestimmt. Die Untersuchungen dienten sowohl zur Festlegung geeigneter Reaktionsbedingungen für die GOS-Synthese, als auch zur Ermittlung eines adäquaten Inaktivierungsregimes.

Es seien zunächst die im neutralen pH-Milieu aktiven  $\beta$ -Galactosidasen aus *K. lactis* und *Lactobacillus* sp. betrachtet. Die Stabilität in Puffer (50 mmol/L Na-Phosphat, ohne Substrat) wurde im Bereich der maximalen Aktivität von pH 6,0–7,0 untersucht. Zudem wurde die Stabilität in Süßmolke (39 g/L Lactose) und konzentrierter Süßmolke (200 g/L Lactose) ermittelt. Abbildung 4-5 zeigt exemplarisch die Ergebnisse für *Lactobacillus reuteri* LR92. Die Arrhenius-Diagramme aller anderen Enzyme inklusive der Rohdaten zur Ermittlung der Geschwindigkeitskonstanten der Denaturierung ( $k_d$ ) finden sich in Anhang 7.3.3.

Je größer  $k_d$  (und damit auch  $\ln(k_d)$ ), desto instabiler ist das Enzym unter den jeweiligen Bedingungen (siehe auch Gleichung 4). Somit wird anhand Abbildung 4-5 deutlich, dass die optimale Stabilität der *L. reuteri*- $\beta$ -Galactosidase bei pH 6,5 gegeben ist, was sich mit dem pH-Optimum deckt. Bei 50°C und pH 6,5 besitzt dieses Enzym eine Halbwertszeit von etwa 63 min, welche sich bei nur leichter pH-Reduktion auf 6,0 bereits mehr als halbiert und bei pH 7,5 um den Faktor 20 verringert (siehe auch Tabelle 4-4). Für die  $\beta$ -Galactosidase aus *L. acidophilus* LA3 wurde die höchste Stabilität bei pH 6,0 detektiert, das pH-Optimum lag jedoch im Bereich von pH 7,0–7,5. Die Halbwertszeiten von *L. acidophilus* in Puffer sind generell sehr niedrig, was sich mit Literaturangaben deckt, wonach Magnesium zur Aufrechterhaltung der Enzymaktivität benötigt wird [68]. Damit ließe sich die Halbwertszeit etwa um das 200-fache<sup>4</sup> erhöhen. Die  $\beta$ -Galactosidasen aus *L. bulgaricus* (LB4, LB8, SP5) zeigen generell alle ein ähnliches Verhalten sowie eine höhere Stabilität gegenüber thermischer Inaktivierung (siehe auch Abbildung A.7-19), was aufgrund des Verlaufs der Temperaturabhängigkeit bzw.

<sup>4</sup> Extrapolation (Arrhenius-Gleichung) der angegebenen Halbwertszeiten bei 22°C, 37°C und 45°C (pH 6,5, 20 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ ) ergibt  $t_{1/2} = 1507$  min bei 50°C, verglichen mit dem in dieser Arbeit bestimmten Wert von 7,8 min.

den breiteren Temperaturoptima bei 50–55°C (vgl. Abbildung 4-3) zu erwarten war. Die Halbwertszeiten bei 50°C sind damit im Vergleich zu *L. acidophilus* und *L. reuteri* um ein Vielfaches höher (Tabelle 4-4). Die in dieser Arbeit ermittelten Halbwertszeiten von ca. 130–380 min (pH 7,0, 50°C) liegen deutlich über der einer rekombinant hergestellten *L. bulgaricus*-Lactase (45 min bei pH 7,0 und 50°C [72]). Generell beeinflusst der pH-Wert im untersuchten Bereich die Enzymstabilität der *L. bulgaricus*-Lactasen weniger stark bzw. lässt keinen klaren Trend erkennen (vgl. Abbildung A.7-19B-D). Das kommerziell erhältliche Enzym aus *K. lactis* weist die geringste Stabilität aller untersuchten  $\beta$ -Galactosidasen auf.



**Abbildung 4-5:** Arrhenius-Diagramm der  $\beta$ -Galactosidase-Inaktivierung von *L. reuteri* LR92 in 50 mmol/L Na-Phosphat-Puffer (pH 6,0–7,0), Süßmolke pH 6,5 (39 g/L Lactose) und konzentrierter Süßmolke pH 6,5 (200 g/L Lactose). Süßmolke rekonstituiert aus Pulver (Molkerei Meggle Wasserburg GmbH & Co. KG).

Die Stabilität in Süßmolke ist gegenüber dem Puffersystem für sehr hohe Temperaturen ( $\geq 70^\circ\text{C}$ ) für alle Enzyme erhöht (vgl. Abbildung A.7-19). Dies kann auf die Anwesenheit des Substrates Lactose zurückgeführt werden, welche vor allem bei hohen Temperaturen die Stabilität positiv beeinflusst [322]. Für die Enzyme aus *L. acidophilus* und *L. reuteri* ist die Verbesserung der Stabilität jedoch auch bei niedrigeren Temperaturen im Bereich der maximalen Enzymaktivität (50°C) zu beobachten (Tabelle 4-4). Prinzipiell kann die Anwesenheit von Lactose jedoch auch zu einer Verringerung der Enzymstabilität führen, so beobachtet mit *B. circulans* bei 25°C [322]. Im vorliegenden Fall ist ebenfalls der Einfluss der Milchsalze sowie möglicher Wechselwirkungen zu berücksichtigen, was letztendlich in einer kaum veränderten Stabilität für *L. bulgaricus* LB8 sowie einer verminderten Stabilität für *L. bulgaricus* LB4 und SP5 (alle bei 50°C) resultiert. Generell ist der Trend analog zum Puffersystem mit einem Anstieg der Stabilität in der Reihenfolge *K. lactis* < *L. acidophilus* < *L. reuteri* < *L. bulgaricus* (Abbildung 4-6). Auch hier ist zu erkennen, dass alle aus *L. bulgaricus* gewonnenen  $\beta$ -Galactosidasen die größte Ähnlichkeit hinsichtlich ihres Verhaltens gegenüber thermischer Inaktivierung aufweisen.

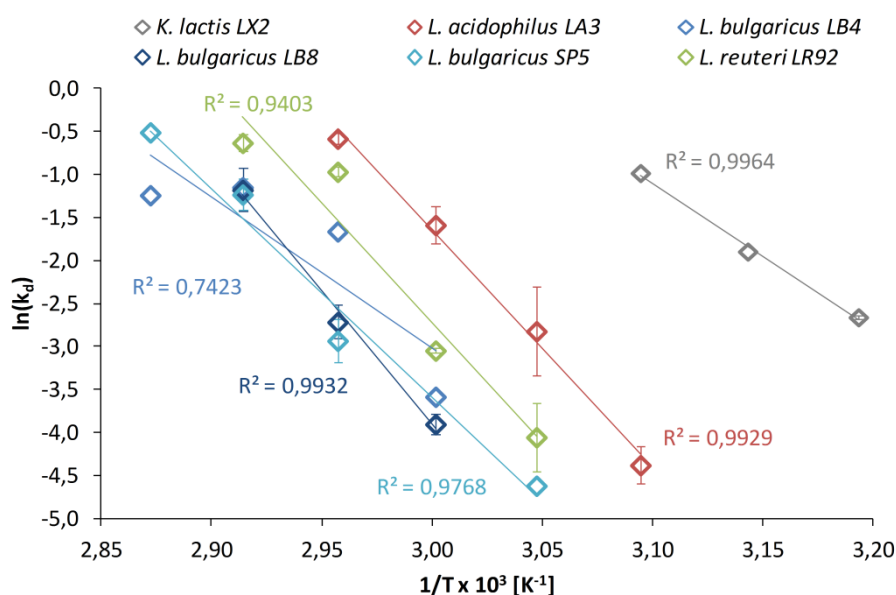
**Tabelle 4-4:** Halbwertszeit  $t_{1/2}$  bei 50°C in Abhängigkeit von der Enzymquelle und dem umgebenden Medium.

Enzymquelle	$t_{1/2}$ [min] bei 50°C <sup>a</sup>					
	50 mmol/L Na-Phosphat-Puffer <sup>b</sup>				Süßmolke <sup>c</sup>	konz. Süßmolke <sup>d</sup>
	pH 6,0	pH 6,5	pH 7,0	pH 7,5		
<i>K. lactis</i> LX2	0,9	0,4	0,3	0,1	2	7
<i>L. acidophilus</i> LA3	16	8	3	1	49	4436
<i>L. bulgaricus</i> LB4	471	263	235	145	76	711
<i>L. bulgaricus</i> LB8	398	631	383	842	656	730
<i>L. bulgaricus</i> SP5	643	328	135	1549	247	50
<i>L. reuteri</i> LR92	28	63	10	3	147	1448

<sup>a</sup> berechnet über Arrhenius-Gleichung, zum Teil extrapoliert. <sup>b</sup> bei Abwesenheit von Substrat. <sup>c</sup> bei 39 g/L Lactose, pH 6,5.

<sup>d</sup> bei 200 g/L Lactose, pH 6,5.

Grundsätzlich führt eine Erhöhung der Lactosekonzentration zu einer verbesserten  $\beta$ -Galactosidase-Stabilität [322], sodass mit Ausnahme von *L. bulgaricus* SP5 der Einsatz von konzentrierter Süßmolke zu einer weiteren Erhöhung der Halbwertszeit bei 50°C führt (Tabelle 4-4). Aufgrund der ebenfalls erhöhten Salzfracht ist das konkrete Resultat wiederum stark von der Enzymquelle abhängig, wobei die größte Beeinflussung bei *L. acidophilus* detektiert wurde.



**Abbildung 4-6:** Arrhenius-Diagramm der Inaktivierung von  $\beta$ -Galactosidasen aus *K. lactis* und *Lactobacillus* sp. in Süßmolke pH 6,5 (39 g/L Lactose). Süßmolke rekonstituiert aus Pulver (Molkerei Meggle Wasserburg GmbH & Co. KG).

Warmerdam et al. [322] fanden für *B. circulans* mit zunehmender Lactosekonzentration (in McIlvaine-Puffer) eine geringere Abhängigkeit der Enzyminaktivierung von der Temperatur, was sich durch die Berechnung des z-Wertes veranschaulichen lässt. Dieser gibt die Temperaturerhöhung an, die notwendig ist, um die dezimale Reduktionszeit (D-Wert) auf 1/10 zu reduzieren. Tabelle 4-5 gibt einen Überblick über die graphisch ermittelten z-Werte (Auftragung des D-Wertes gegen die

Temperatur) bei pH 6,5. Für kleine Temperaturbereiche kann der z-Wert (vor allem für Aktivierungsenergien im Bereich der Enzyminaktivierung von 250–350 kJ/mol) als weitestgehend konstant angesehen werden [320]. Die Berechnung des z-Wertes erfolgte über den gesamten jeweils untersuchten Temperaturbereich, wobei die maximale Differenz 20 K betrug.

**Tabelle 4-5:** Z-Wert in Abhängigkeit von der Enzymquelle und dem umgebenden Medium bei pH 6,5.

Enzymquelle	z-Wert [K]		
	Puffer <sup>a</sup>	Süßmolke <sup>b</sup>	konz. Süßmolke <sup>c</sup>
<i>K. lactis</i> LX2	6,5	13,7	9,4
<i>L. acidophilus</i> LA3	9,0	9,0	8,3
<i>L. bulgaricus</i> LB4	8,4	15,2	14,5
<i>L. bulgaricus</i> LB8	6,3	8,5	10,7
<i>L. bulgaricus</i> SP5	7,4	10,8	2,5
<i>L. reuteri</i> LR92	7,5	9,2	8,4

<sup>a</sup> 50 mmol/L Na-Phosphat bei Abwesenheit von Substrat. <sup>b</sup> bei 39 g/L Lactose. <sup>c</sup> bei 200 g/L Lactose.

Die z-Werte in Puffer liegen generell in einer vergleichbaren Größenordnung mit Literaturwerten für  $\beta$ -Galactosidasen aus *K. marxianus* (6,6 K [323]), *B. circulans* (9,5 K [322]) und *L. bulgaricus* (6,5 K [72])<sup>5</sup>. Die Verwendung von Molke bzw. konzentrierter Molke und somit die Erhöhung der Lactosekonzentration zeigt jedoch keinen klaren Trend. Während der z-Wert in Molke im Vergleich zu Puffer (mit Ausnahme von *L. acidophilus* LA3) für alle Enzyme zunimmt, d. h. die Inaktivierung somit weniger stark von der Temperatur beeinflusst wird (analog der Ergebnisse von Warmerdam et al. [322]), ergibt sich in konzentrierter Molke für fast alle Enzyme (mit Ausnahme von *L. bulgaricus* LB8) wiederum eine höhere Temperaturabhängigkeit gegenüber Molke. Somit kann auch hier von einem Einfluss der enthaltenen Milchsäure und/oder Molkenproteine ausgegangen werden.

Im Folgenden sei auf die Stabilität der Lactasen aus *A. oryzae* und *C. laurentii* eingegangen, welche für die GOS-Synthese in Sauermolke eingesetzt werden sollen. Neben Puffer (pH 4,5) wurde daher die Inaktivierungskinetik in verschiedenen Arten von Sauermolke bestimmt. Generell wirkten sich auch bei diesen beiden Lactasen die Molke-Inhaltsstoffe positiv auf die Enzymstabilität aus (siehe Abbildung A.7-20). Anhand der mittels Arrhenius-Gleichung extrapolierten Halbwertszeiten am Temperaturoptimum von 55°C (Tabelle 4-6), ist eine stabilisierende Wirkung der rekonstituierten Sauermolke bzw. der Caseinmolke im Vergleich zum Puffersystem zu erkennen. Diese kann wiederum auf das Vorhandensein von Lactose zurückgeführt werden. Im Gegensatz dazu verringert sich die Halbwertszeit in Molke aus der Griechischen Joghurt-Produktion bzw. dem mit ca. 210 g/L stark lactosehaltigen Sauermolkenpermeatkonzentrat im Vergleich zur Caseinmolke. Eine mögliche Erklärung ist das zusätzliche Vorhandensein von Galactose in diesen Proben (Tabelle 4-2). Galactose kann mit oNPG um das aktive Zentrum konkurrieren und somit die scheinbare Enzymaktivität (und damit auch –stabilität) herabsetzen.

<sup>5</sup> eigene Berechnung aus den gegebenen Daten, jeweils bei Abwesenheit von Substrat.

**Tabelle 4-6:** Halbwertszeit  $t_{1/2}$  bei 55°C in Abhängigkeit von der Enzymquelle und dem umgebenden Medium, n. b. = nicht bestimmt.

Enzymquelle	$t_{1/2}$ [h] bei 55°C <sup>a</sup>				
	Puffer <sup>d</sup>	rek. Sauermolke <sup>e</sup>	Caseinmolke <sup>f</sup>	GJ-Molke <sup>g</sup>	konz. SMP <sup>h</sup>
<i>A. oryzae</i> <sup>b</sup>	3	n. b.	10	n. b.	7
<i>C. laurentii</i> <sup>c</sup>	167	212	363	139	n. b.

<sup>a</sup> berechnet über Arrhenius-Gleichung, extrapoliert. <sup>b</sup> Maxilact A4. <sup>c</sup> ganze Zellen. <sup>d</sup> 50 mmol/L Mcllvaine pH 4,5 ohne Lactose. <sup>e</sup> rekonstituierte Sauermolke (39 g/L Lactose, Pulver von Euroduna Food Ingredients GmbH). <sup>f</sup> ca. 51 g/L Lactose. <sup>g</sup> Griechische Joghurt-Molke, ca. 37 g/L Lactose. <sup>h</sup> konzentriertes Sauermolkenpermeat, ca. 210 g/L Lactose. Teile der Tabelle sind Bestandteil von Tab. 5 in [CF1].

Der Einfluss der Temperatur auf die  $\beta$ -Galactosidase-Inaktivierung ist für *A. oryzae* und *C. laurentii* insgesamt geringer als für die *Lactobacillus*-Lactasen (Tabelle 4-5 und Tabelle 4-7). Analog zu letztgenannten lässt sich auch bei den sauren Lactasen keine Abhängigkeit vom Medium feststellen.

**Tabelle 4-7:** Z-Wert in Abhängigkeit von der Enzymquelle und dem umgebenden Medium bei pH 4,5, n. b. = nicht bestimmt.

Enzymquelle	z-Wert [K]				
	Puffer <sup>c</sup>	rek. Sauermolke <sup>d</sup>	Caseinmolke <sup>e</sup>	GJ-Molke <sup>f</sup>	konz. SMP <sup>g</sup>
<i>A. oryzae</i> <sup>a</sup>	6,4	n. b.	5,2	n. b.	5,6
<i>C. laurentii</i> <sup>b</sup>	4,0	4,3	3,9	4,3	n. b.

<sup>a</sup> Maxilact A4. <sup>b</sup> ganze Zellen. <sup>c</sup> 50 mmol/L Mcllvaine pH 4,5 ohne Lactose. <sup>d</sup> rekonstituierte Sauermolke (39 g/L Lactose, Pulver von Euroduna Food Ingredients GmbH). <sup>e</sup> ca. 51 g/L Lactose. <sup>f</sup> Griechische Joghurt-Molke, ca. 37 g/L Lactose. <sup>g</sup> konzentriertes Sauermolkenpermeat, ca. 210 g/L Lactose.

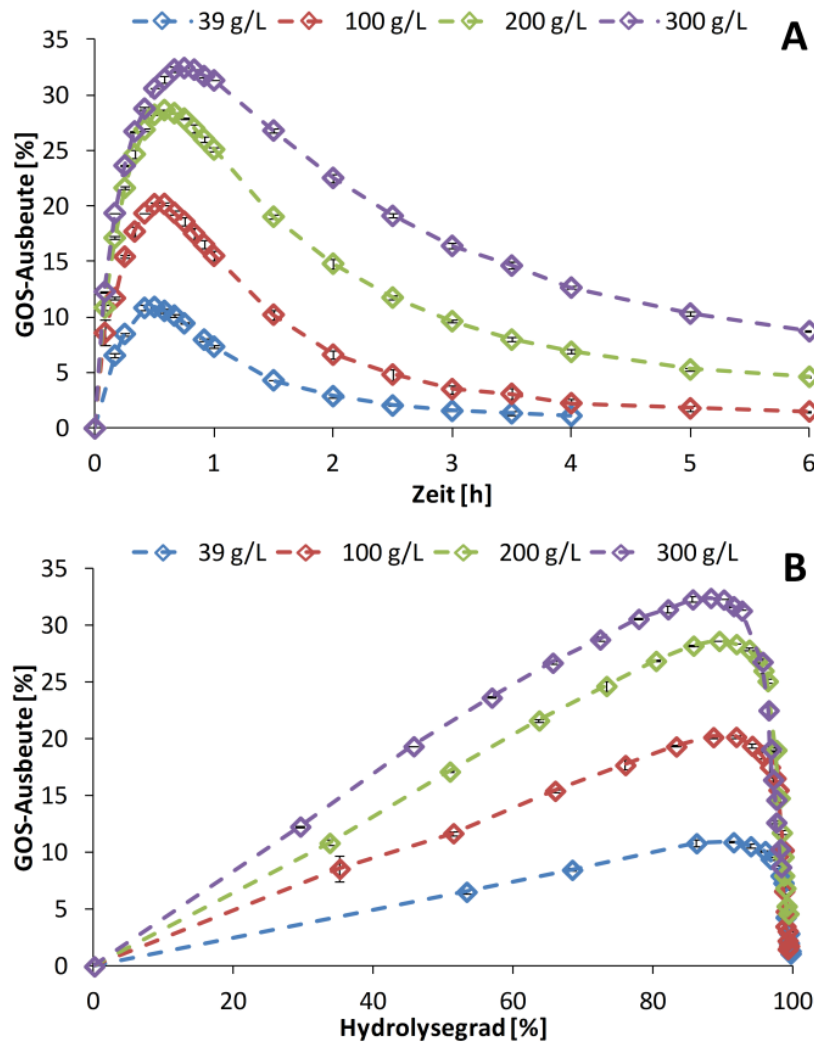
Aufgrund der Abhängigkeit der GOS-Ausbeute von der Reaktionszeit, ist eine adäquate Temperatur-Zeit-Kombination für die Enzyminaktivierung festzulegen. Mit Hilfe der experimentell ermittelten D-Werte wurde die Heißhaltezeit für eine 99 %-ige Enzymabtötung berechnet. Eine Kurzzeiterhitzung ist nur für das Enzym aus *K. lactis* möglich, für alle anderen  $\beta$ -Galactosidasen ist eine UHT-Behandlung oder vergleichbar notwendig (siehe auch Abbildung A.7-21).

## 4.3 Synthese von Galactooligosacchariden

### 4.3.1 Synthese mit $\beta$ -Galactosidase aus *K. lactis*

#### 4.3.1.1 Synthese in Puffer

Um einen Vergleich für die Eignung des Mediums Molke zu schaffen, wurde die GOS-Synthese zunächst unter „optimalen Bedingungen“, d. h. in einem geeigneten Puffersystem durchgeführt. Hierfür wurde der in der FCC-Methode [64] empfohlene Phosphat-EDTA-Magnesium-Puffer (kurz: PEM-Puffer) verwendet. Es sei zunächst der Einfluss der initialen Lactosekonzentration auf Transgalactosylierung und Hydrolyse betrachtet (Abbildung 4-7).



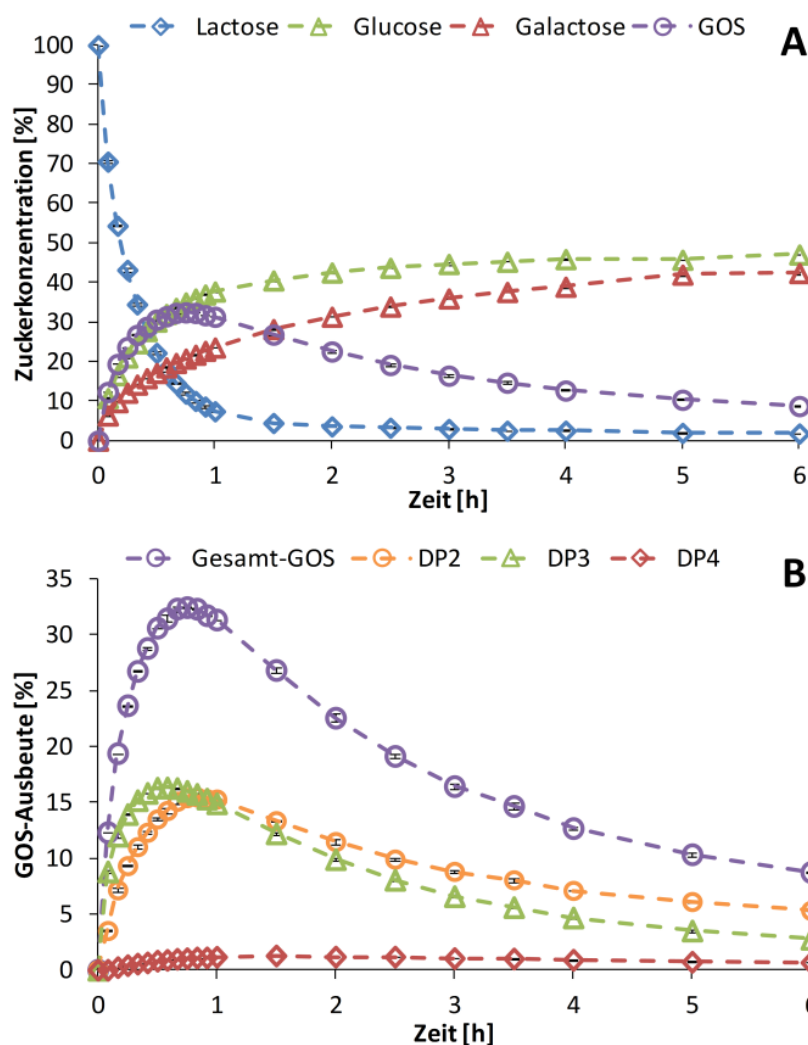
**Abbildung 4-7:** GOS-Ausbeute mit  $\beta$ -Galactosidase aus *K. lactis* (optilactase LX2) in PEM-Puffer in Abhängigkeit von der Reaktionszeit (A) und dem Lactoseumsatz (B). Reaktionsbedingungen: pH 6,5, 45°C, 50 U/g, n = 2. Legende gibt die ILC (gerundet) wieder, tatsächliche Werte siehe Tabelle A.7-8.

Erwartungsgemäß steigt mit zunehmender Anfangslactosekonzentration die Ausbeute an GOS. Während bei einer sehr niedrigen Lactosekonzentration von unter 40 g/L eine Ausbeute von ca. 10,9 % erzielt werden konnte, ergab sich bei Erhöhung der Substratkonzentration auf 300 g/L eine Verdreifachung der Ausbeute auf ca. 32,5 %. Der Lactoseumsatz zum Zeitpunkt der maximalen Ausbeute ist mit ca. 90 % (Abbildung 4-7B) unabhängig von der eingesetzten Lactosekonzentration und spiegelt die hohe hydrolytische Aktivität der *K. lactis*- $\beta$ -Galactosidase wider. Durch die gleichbleibende, substratbezogene Enzymkonzentration von 50 U/g verschiebt sich der Zeitpunkt der maximalen Ausbeute im ILC-Bereich von 40–200 g/L kaum (Abbildung 4-7A), erhöht sich allerdings um 50 % (von 30 min auf 45 min) bei 300 g/L ILC aufgrund des langsameren Lactoseumsatzes (siehe auch Abbildung A.7-23A).

Abbildung 4-8 zeigt exemplarisch für eine ILC von 300 g/L den Substratverbrauch und die Produktbildung (A) sowie die Synthese der einzelnen GOS-Fractionen (B) in Abhängigkeit von der Reaktionszeit. Aufgrund der hohen Verfügbarkeit der Lactose wird diese vor allem zu Beginn der Reaktion als Akzeptor genutzt, was in der Synthese von Galactosyllactosen (DP 3) resultiert. Deren Anteil über-



wiegt daher am Anfang der Reaktion (Abbildung 4-8B). Durch die hohe hydrolytische Aktivität des *K. lactis*-Enzyms wird neben Glucose zeitnah auch Galactose in das Reaktionsmedium freigesetzt (Abbildung 4-8A). Da beide Monosaccharide von *K. lactis* als Akzeptor genutzt werden können [126], kommt es folglich zur vermehrten Bildung von GOS-Disacchariden, welche am Ausbeutemaximum in ähnlichen Konzentrationen wie die GOS-Trisaccharide vorliegen. Mono- und Disaccharide werden als Galactosyl-Akzeptoren präferiert, sodass der Anteil der Tetrasaccharide an den Gesamt-GOS nur ca. 3 % beträgt, was etwa 1 % bezogen auf die Gesamtzucker entspricht.

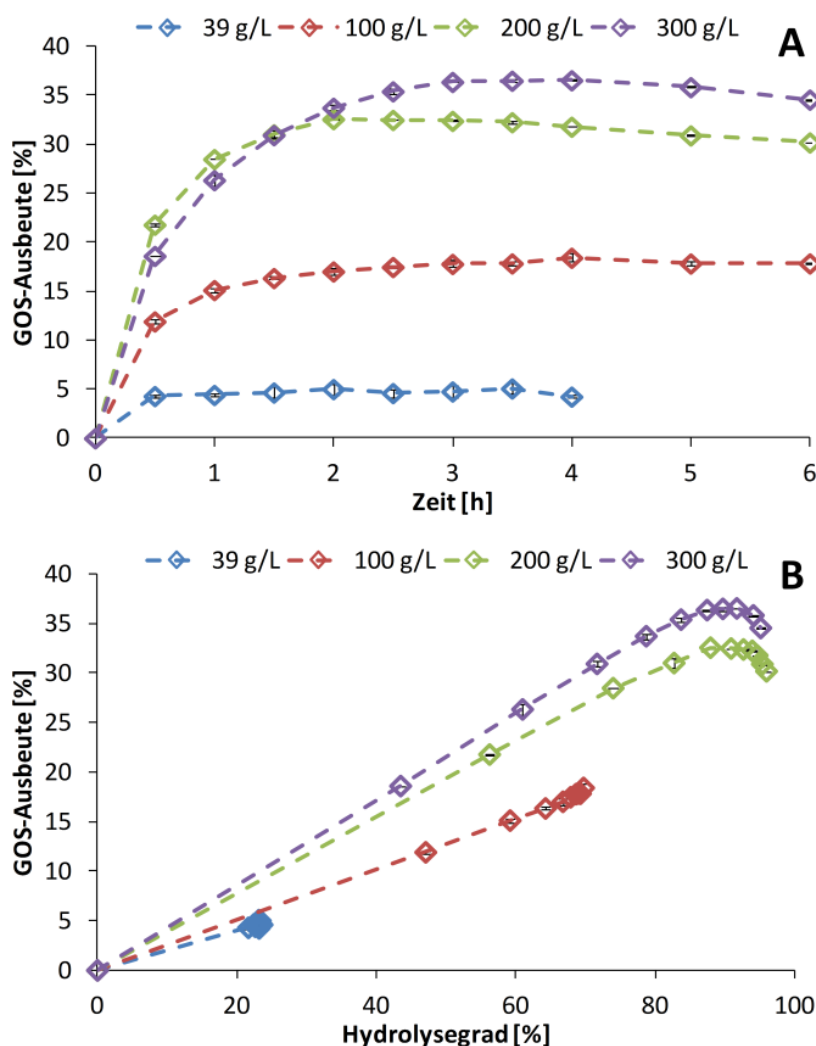


**Abbildung 4-8:** GOS-Synthese mit  $\beta$ -Galactosidase aus *K. lactis* (optilactase LX2) in PEM-Puffer in Abhängigkeit von der Reaktionszeit. A: Substratverbrauch und Produktbildung. B: Bildungskinetik der einzelnen GOS-Fractionen (DP = Polymerisationsgrad). Reaktionsbedingungen: ILC 300 g/L, pH 6,5, 45°C, 50 U/g, n=2.

#### 4.3.1.2 Synthese in Süßmolke

Ähnlich wie im Puffersystem führt auch in Süßmolke eine höhere Anfangslactosekonzentration zu einer verbesserten GOS-Ausbeute (Abbildung 4-9). Die benötigte Reaktionszeit bis zum Erreichen des Ausbeutemaximums ist jedoch deutlich länger (Abbildung 4-7A und Abbildung 4-9A). Dies kann durch eine Beeinflussung des Enzyms durch Salze und/oder Proteine erklärt werden. Vor allem in den niedrig konzentrierten Süßmolken (ILC 39 g/L und 100 g/L) wird die inhibierende Wirkung sichtbar. Zum einen ist die maximale Ausbeute deutlich (4,3 % im Vergleich zu 10,9 % bei 39 g/L ILC) bzw. leicht (18,4 % im Vergleich zu 20,2 % bei 100 g/L ILC) vermindert, zum anderen erreicht die GOS-Konzentration eine Art Plateau (Abbildung 4-9A). Die gebildeten GOS werden demnach nicht wie erwartet abgebaut, was auf eine Inaktivierung der  $\beta$ -Galactosidase während der Reaktion hinweist. Diese Vermutung wird durch einen deutlich verminderten Lactoseabbau gestützt (siehe Abbildung A.7-23B bzw. Abbildung 4-9B), der nach ca. 0,5 h bzw. 2 h zum Erliegen kommt und somit mit dem Verlauf der GOS-Konzentration korreliert. Diese inhibierende Wirkung überrascht einerseits, da keines der untersuchten Kationen einen negativen Effekt zeigte (Tabelle 4-3). Im Gegenteil, Natrium, Ammonium und Kalium wirkten stark aktivierend. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass die genannten Untersuchungen mit dem künstlichen Substrat oNPG durchgeführt wurden und der Einfluss beim natürlichen Substrat Lactose anders sein kann. Beispielsweise wiesen Mozaffar et al. [3] bei 45 g/L Lactose einen inhibierenden Effekt von  $\text{Ca}^{2+}$  (1–5 mmol/L) und  $\text{Na}^+$  (25–100 mmol/L) auf das *K. lactis*-Enzym nach, während  $\text{K}^+$  (25–100 mmol/L) und  $\text{Mg}^{2+}$  (2–10 mmol/L) die Enzymaktivität nicht bzw. nur geringfügig verbesserten. Somit ließe sich die geringe Stabilität dieses Enzyms in Süßmolke erklären. Aus dem ermittelten D-Wert bei 45°C (ca. 15,3 min) ergibt sich eine 99 %-ige Enzymdenaturierung nach ca. 30,5 min, was mit den vorliegenden Daten der GOS-Synthese konform ist. Durch eine Erhöhung der anfänglichen Enzymkonzentration bzw. eine Absenkung der Reaktionstemperatur ließe sich die effektive Reaktionszeit verlängern und somit möglicherweise die Ausbeute steigern. Hellerová & Čurda [170] ermittelten in Süßmolke unter vergleichbaren Bedingungen (ILC 47 g/L, pH 6,75) bei 37°C eine GOS-Ausbeute von 6,7 %, was in einer Größenordnung mit der in dieser Arbeit ermittelten Ausbeute liegt.

Mit weiterer Aufkonzentrierung der Süßmolke (ILC 200 g/L und 300 g/L) und damit einhergehend auch der Aufkonzentrierung der potenziellen Inhibitoren kommt es jedoch zu einer insgesamt verbesserten GOS-Synthese im Vergleich zum Puffersystem. So konnte bei einer Anfangskonzentration von 300 g/L Lactose sogar eine signifikant höhere GOS-Ausbeute (36,5 %) im Vergleich zum PEM-Puffer (32,4 %) erzielt werden (siehe auch Tabelle A.7-14). Dennoch bleibt ein gewisser inhibierender Effekt bestehen, da sowohl die GOS-Synthese als auch der Lactoseumsatz (siehe Abbildung A.7-23B) zeitlich verzögert sind. Eine entsprechende Konzentration vorausgesetzt, wirken sich die Molke-Inhaltsstoffe in Summe jedoch positiv auf die Transgalactosylierungsaktivität der *K. lactis*- $\beta$ -Galactosidase aus. Es ist davon auszugehen, dass dies vor allem auf die Magnesium-Ionen zurückzuführen ist. Deren Anwesenheit ist für das *K. lactis*-Enzym entscheidend für eine erfolgreiche GOS-Synthese [174]. Trotz einer  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentration von ca. 2,8 mmol/L in der unkonzentrierten Molke, scheint diese Konzentration aufgrund des negativen Einflusses der weiteren Komponenten nicht ausreichend, um das Enzym vor einer Inaktivierung zu schützen.



**Abbildung 4-9:** GOS-Ausbeute mit  $\beta$ -Galactosidase aus *K. lactis* (optilactase LX2) in Süßmolke (ILC 39 g/L) und konzentrierter Süßmolke (ILC 100-300 g/L) in Abhängigkeit von der Reaktionszeit (A) und dem Lactoseumsatz (B). Reaktionsbedingungen: pH 6,5, 45°C, 50 U/g, n =2. Süßmolke rekonstituiert aus Pulver (Molkerei Meggle Wasserburg GmbH & Co. KG). Legende gibt die ILC (gerundet) wieder, tatsächliche Werte siehe Tabelle A.7-8.

Einen positiven Einfluss der Molkebestandteile auf die Transgalactosylierungsaktivität der  $\beta$ -Galactosidase aus *K. lactis* fanden auch Pocedičová et al. [324] mit einem Anstieg der Ausbeute von 12,9 % (Puffer) auf 15,5 % (Molke) bei jeweils ca. 200 g/L ILC. Die Zeit bis zum Ausbeutemaximum verdoppelte sich, was prinzipiell konform mit den hier dargestellten Ergebnissen ist. Allerdings fanden die genannten Autoren auch einen Einfluss auf den erreichten Lactosehydrolysegrad zum Zeitpunkt der maximalen GOS-Ausbeute (ca. 73 % in Puffer, ca. 59 % in Molke). Dies kann mit den eigenen Untersuchungen nur bestätigt werden, sofern eine vollständige Enzyminaktivierung im Verlauf der Reaktion beobachtet wurde (vgl. 39 g/L und 100 g/L in Abbildung 4-7B und Abbildung 4-9B). Andernfalls wurde das Ausbeutemaximum unabhängig vom verwendeten Medium jeweils bei ca. 90 % Hydrolyse erreicht (vgl. 200 g/L und 300 g/L in Abbildung 4-7B und Abbildung 4-9B).

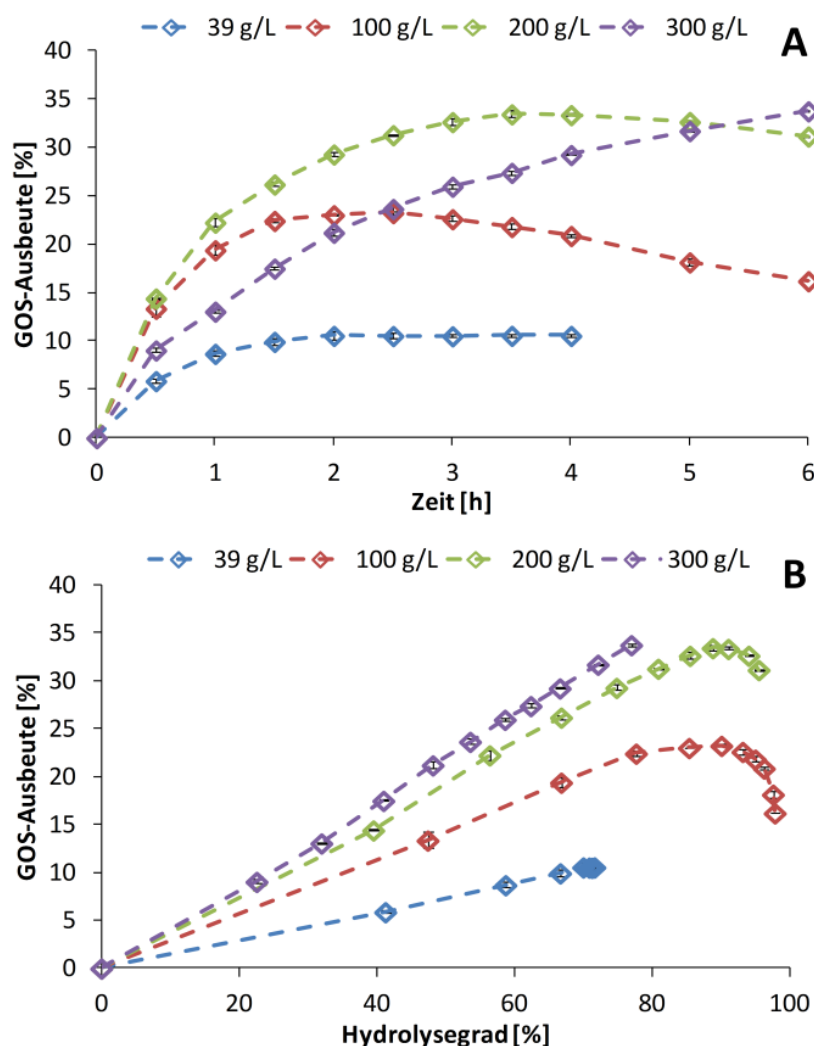
Je nach eingesetztem Enzympräparat gibt es unterschiedliche Angaben über den Einfluss der ILC in Molkenpermeat [172, 325]. Dies legt eine gewisse Abhängigkeit der Ergebnisse vom verwendeten Enzymprodukte nah. Um dies zu untersuchen, wurden verschiedene aus *K. lactis* gewonnene  $\beta$ -Galactosidasen in konzentrierter Süßmolke (ILC 200 g/L) getestet. Es wurden jedoch keine Unterschiede

in der Transgalactosylierungsaktivität festgestellt (siehe Abbildung A.7-24). Demnach ist zu vermuten, dass unterschiedliche Ergebnisse von verschiedenen Autorengruppen eher auf die verwendete Molke, als auf das spezifische Enzympräparat zurückzuführen sind. Wie aus Abbildung 4-9 ersichtlich, ist nicht nur das Verhältnis der Milchsäure untereinander, sondern auch die absolute Konzentration entscheidend für den GOS-Syntheseerfolg. Beides kann in Molken unterschiedlicher Hersteller variieren und somit einen Einfluss auf das Endergebnis haben.

### **4.3.1.3 Synthese in Sauermolke**

Ähnlich wie bei Süßmolke ist auch in Sauermolke und deren Konzentraten die GOS-Synthese im Vergleich zum PEM-Puffer zeitlich verzögert (Abbildung 4-10A). Allerdings ist der Einfluss auf die  $\beta$ -Galactosidase-Stabilität weniger stark ausgeprägt. Beispielsweise wird in der nicht konzentrierten Sauermolke (ILC 39 g/L) erst nach ca. 2 h ein Plateau der GOS-Ausbeute erreicht, was ebenfalls mit einer Stagnation des Lactoseabbaus (Abbildung A.7-23C) einhergeht und auf eine vollständige Enzyminaktivierung hindeutet. Aufgrund der erhöhten Stabilität im Vergleich zu Süßmolke, konnte jedoch eine GOS-Ausbeute von ca. 10,6 % erreicht werden, welche sich nicht signifikant von der im Puffersystem erzielten Ausbeute unterscheidet (siehe Tabelle A.7-14). Diese verbesserte Stabilität kann vermutlich auf die höhere  $Mg^{2+}$ -Konzentration (4,9 mmol/L) zurückgeführt werden. Dies vermag den potenziell inhibierenden Effekt der ebenfalls deutlich höheren  $Ca^{2+}$ -Konzentration (25,5 mmol/L) auszugleichen.

Eine Aufkonzentrierung der Sauermolke und damit eine Erhöhung der anfänglichen Lactosekonzentration bewirkt ähnlich wie in Puffer und Süßmolke einen Anstieg der GOS-Ausbeute. Trotz einer langsameren Lactoseumwandlung ist die Hemmwirkung im Sinne der vollständigen Enzyminaktivierung bei 100 g/L ILC bereits nicht mehr kritisch, da innerhalb des untersuchten Zeitraums ein Hydrolysegrad von ca. 98 % erreicht werden konnte (99 % in PEM-Puffer) und somit das tatsächliche GOS-Ausbeutemaximum, welches unabhängig vom Medium bei etwa 90 % erreicht wird (Abbildung 4-10B), ermittelt werden konnte. Dieses liegt mit 23,3 % leicht über der GOS-Ausbeute in Puffer (20,2 %). Dieser zunächst positive Einfluss der Molke-Inhaltsstoffe auf den Lactoseabbau führt bei weiterer Konzentrierung zu einer deutlichen Reduktion der Umsatzgeschwindigkeit (siehe Abbildung A.7-23C), sodass bei einer ILC von 300 g/L innerhalb des Untersuchungszeitraums von 6 h nur ein Hydrolysegrad von 77 % erzielt werden konnte. Die in dieser Zeit erreichte GOS-Ausbeute (33,8 %) ist mit der in Puffer (32,4 %) vergleichbar. Wie aus Abbildung 4-10 ersichtlich, ist jedoch bei Verlängerung der Reaktionszeit mit einem weiteren Anstieg der Ausbeute zu rechnen. Demnach kann man auch hier von einer verbesserten Transgalactosylierungsaktivität verglichen mit dem Puffersystem sprechen, d. h. die Bestandteile der Molke wirken sich in Summe positiv auf die GOS-Synthese aus, insbesondere in hochkonzentrierten Lösungen.



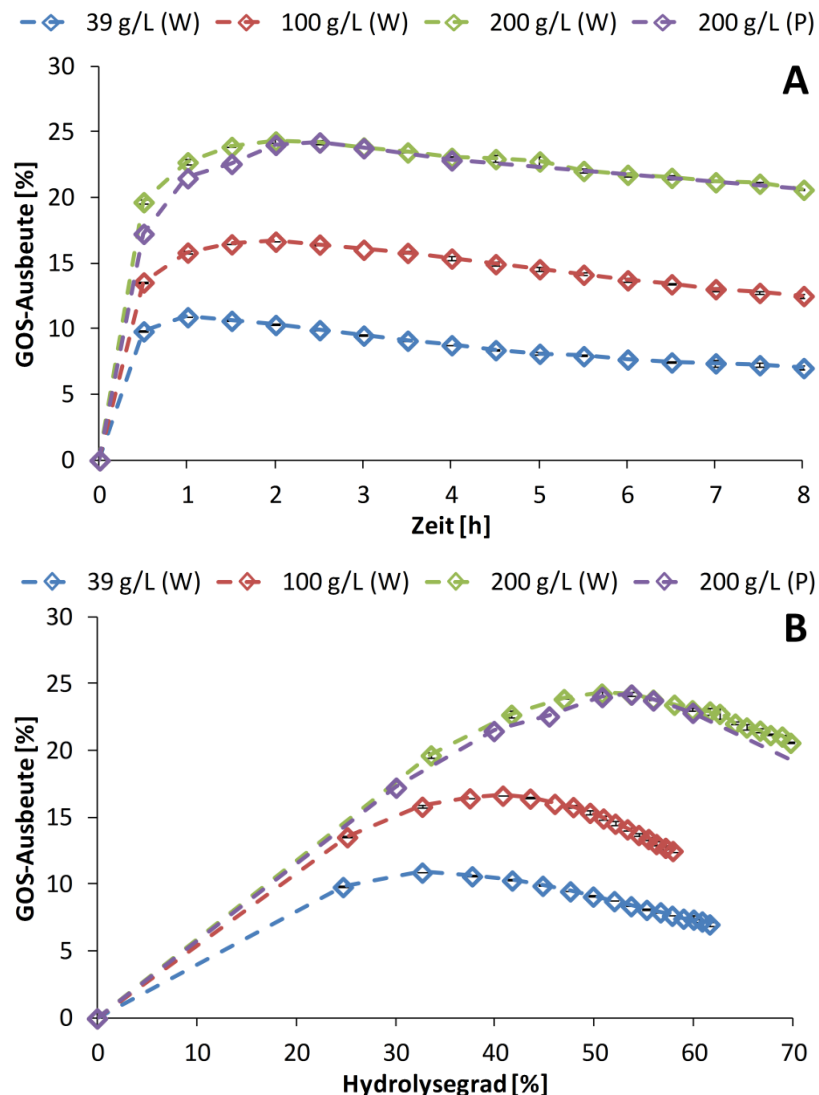
**Abbildung 4-10:** GOS-Ausbeute mit  $\beta$ -Galactosidase aus *K. lactis* (optilactase LX2) in Sauermolke (ILC 39 g/L) und konzentrierter Sauermolke (ILC 100–300 g/L) in Abhängigkeit von der Reaktionszeit (A) und dem Lactoseumsatz (B). Reaktionsbedingungen: pH 6,5, 45°C, 50 U/g, n = 2. Sauermolke rekonstituiert aus Pulver (Euroduna Food Ingredients GmbH). Legende gibt die ILC (gerundet) wieder, tatsächliche Werte siehe Tabelle A.7-8.

## 4.3.2 Synthese mit $\beta$ -Galactosidase aus *A. oryzae*

### 4.3.2.1 Synthese in Puffer

Zur Beurteilung der GOS-Synthese mit *A. oryzae* wurden zwei Enzympräparate (optilactase A50 und Maxilact A4) in deionisiertem Wasser bzw. McIlvaine-Puffer bei Variation der anfänglichen Lactosekonzentration getestet (Abbildung 4-11). Die Erhöhung der ILC wirkt sich erwartungsgemäß positiv auf die GOS-Ausbeute aus. Eine Verfünffachung der ILC steigert die Ausbeute von 10,9 % auf 24,3 %. Weder die Wahl des Enzympräparates, noch die Pufferzusammensetzung (vgl. Ergebnisse bei 200 g/L ILC) beeinflussen die GOS-Ausbeute (Abbildung 4-11A) bzw. das Verhältnis von Transgalactosylierung zu Hydrolyse (Abbildung 4-11B) noch den Lactoseabbau (Abbildung A.7-25). Im Vergleich zur  $\beta$ -Galactosidase aus *K. lactis* ist die Geschwindigkeit der Lactoseumwandlung jedoch deutlich reduziert (vgl. Abbildung A.7-23A und Abbildung A.7-25A). Weiterhin wird die maximale GOS-

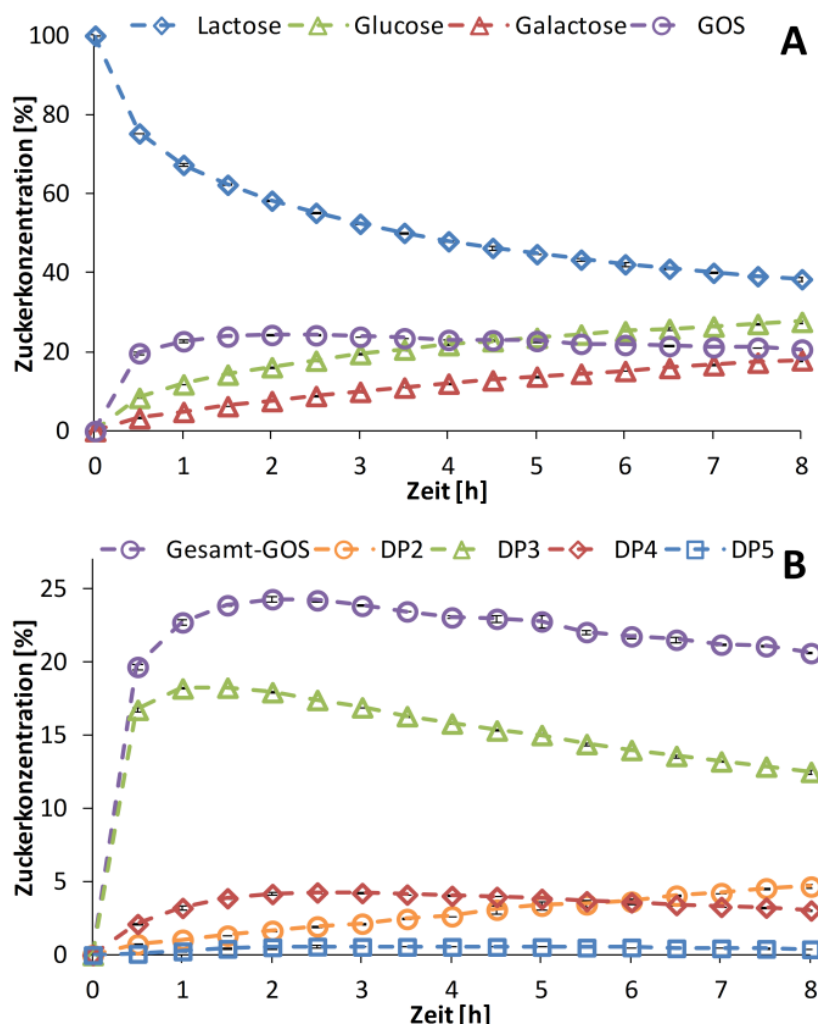
Ausbeute mit *A. oryzae*- $\beta$ -Galactosidasen bei einem niedrigeren Hydrolysegrad erreicht (Abbildung 4-11B). Dieser steigt bei Erhöhung der Anfangslactosekonzentration (von 33 % bei ILC 39 g/L auf 51 % bei ILC 200 g/L), was mit Literaturangaben übereinstimmt [132, 146, 147].



**Abbildung 4-11:** GOS-Ausbeute mit  $\beta$ -Galactosidase aus *A. oryzae* in deion. Wasser (W, optilactase A50) und McIlvaine-Puffer (P, Maxilact A4) in Abhängigkeit von der Reaktionszeit (A) und dem Lactoseumsatz (B). Reaktionsbedingungen: pH 4,5, 55°C, 50 U/g, n = 2 (W), n = 1 (P). Legende gibt die ILC (gerundet) wieder, tatsächliche Werte siehe Tabelle A.7-8. GOS-Analytik nur auf der Hi-Plex Na-Säule für ILC = 100 g/L, d. h. angegebene Ausbeute enthält keine Disaccharide.

Abbildung 4-12 zeigt exemplarisch für 200 g/L ILC die Umwandlung von Lactose in Glucose, Galactose und GOS (A) sowie die Zusammensetzung der GOS-Fraktion hinsichtlich der gebildeten Kettenlängen (B). Zu Reaktionsbeginn dominieren Trisaccharide, welche nach 1,5 h eine maximale Konzentration von 18,3 % erreichen. Die nachfolgende Abnahme ist einerseits auf den generellen GOS-Abbau (Maximum wird nach 2 h erreicht) zurückzuführen, andererseits auf die Umwandlung zu Tetrasacchariden. Diese erreichen eine Maximalkonzentration von 4,3 % nach 2,5 h. Auch Pentasaccharide konnten in Konzentrationen von bis zu 0,6 % nachgewiesen werden. Die Tendenz des *A. oryzae*-Enzyms, Di- und höhere Oligosaccharide als Akzeptormolekül zu nutzen ist demnach generell höher als beim *K. lactis*-Enzym. Im Gegensatz dazu sind Monosaccharide eher schwache

Akzeptoren mit einer GOS-Disaccharidkonzentration von nur 1,6 % nach 2 h. Aufgrund des GOS- und Lactoseabbaus mit fortschreitender Reaktionszeit, steigt jedoch die Konzentration an freien Monosacchariden kontinuierlich auf bis zu 31 % (Glucose) bzw. 18 % (Galactose) nach 8 h (Abbildung 4-12A), was wiederum ihre Verfügbarkeit als Akzeptormolekül erhöht. Somit steigt auch die Konzentration an GOS-Disacchariden stetig auf bis zu 4,7 % an.

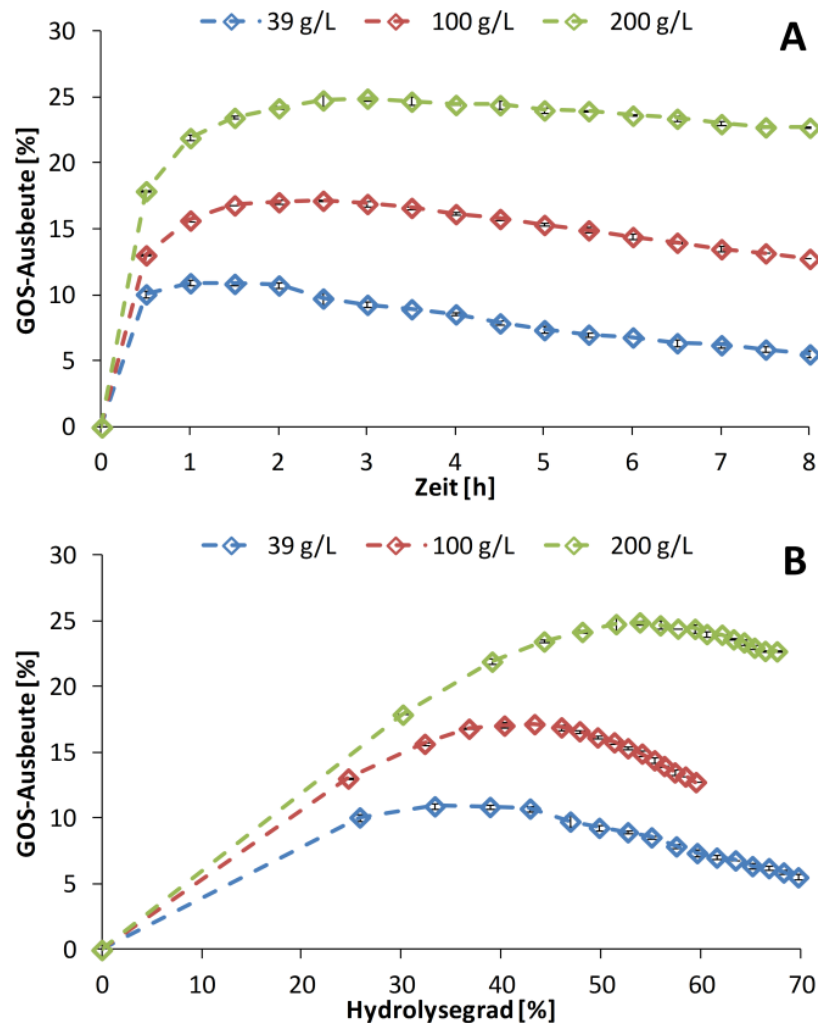


**Abbildung 4-12:** GOS-Synthese mit  $\beta$ -Galactosidase aus *A. oryzae* (optilactase A50) in deion. Wasser in Abhängigkeit von der Reaktionszeit. A: Substratverbrauch und Produktbildung. B: Bildungskinetik der einzelnen GOS-Fractionen (DP = Polymerisationsgrad). Reaktionsbedingungen: ILC 200 g/L, pH 4,5, 55°C, 50 U/g, n=2.

#### 4.3.2.2 Synthese in Süßmolke

Aufgrund des optimalen Wirkungsbereichs der *A. oryzae*- $\beta$ -Galactosidase im sauren Milieu, wurde der pH-Wert von Süßmolke vor der Reaktion auf pH 4,5 abgesenkt. Die maximal erreichbaren GOS-Ausbeuten unterscheiden sich nicht signifikant von denen in Puffer bzw. deion. Wasser (Tabelle A.7-14). Ebenso ähnelt sich auch der zeitliche Reaktionsverlauf (Abbildung 4-13 und Abbildung 4-11). Die in der Molke vorhandenen Salze verursachen somit keine Veränderung des Transgalactosylierungsverhaltens dieses Enzyms. Dies deckt sich mit den Beobachtungen hinsichtlich der Beeinflussung der oNPG-Aktivität. Die Ausbeuten von 10,9 % bei 39 g/L ILC bzw. 24,9 % bei 200 g/L ILC

liegen in einem ähnlichen Bereich wie die von Rustom et al. [172] publizierte Ausbeute von 17,9 % in Süßmolkenpermeat (140 g/L ILC). Demnach scheinen auch die Molkenproteine keinen oder nur einen marginalen Einfluss auf die  $\beta$ -Galactosidase aus *A. oryzae* zu haben.



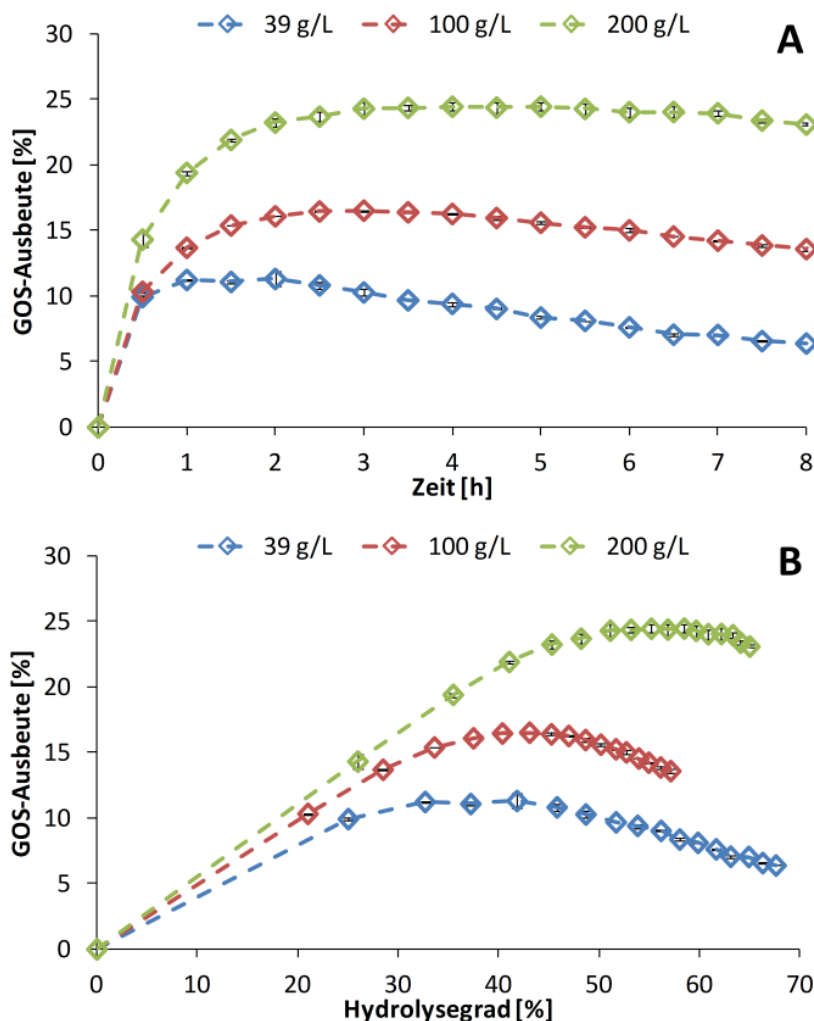
**Abbildung 4-13:** GOS-Ausbeute mit  $\beta$ -Galactosidase aus *A. oryzae* (optilactase A50) in Süßmolke (ILC 39 g/L) und konzentrierter Süßmolke (ILC 100–200 g/L) in Abhängigkeit von der Reaktionszeit (A) und dem Lactoseumsatz (B). Reaktionsbedingungen: pH 4,5, 55°C, 50 U/g,  $n = 2$ . Süßmolke rekonstituiert aus Pulver (Molkerei Meggle Wasserburg GmbH & Co. KG). Legende gibt die ILC (gerundet) wieder, tatsächliche Werte siehe Tabelle A.7-8. GOS-Analytik nur auf der Hi-Plex Na-Säule für ILC = 100 g/L, d. h. angegebene Ausbeute enthält keine Disaccharide.

#### 4.3.2.3 Synthese in Sauermolke

Auch in Sauermolke bzw. Sauermolkenkonzentrat ähneln sich Ausbeuten und Reaktionsverläufe denen in deion. Wasser/Puffer (Abbildung 4-14). Allerdings ist bei einer hohen Lactosekonzentration von 200 g/L sowohl der Lactoseabbau (siehe Abbildung A.7-25C) als auch der GOS-Aufbau im Vergleich zu Puffer zeitlich verzögert (maximale Ausbeute nach 2 h bzw. 4 h). Da keines der untersuchten Ionen eine Aktivitätsverringering zeigte, muss von Wechselwirkungseffekten ausgegangen werden, die vor allem in konzentrierter Sauermolke zu einer reduzierten Umsatz-



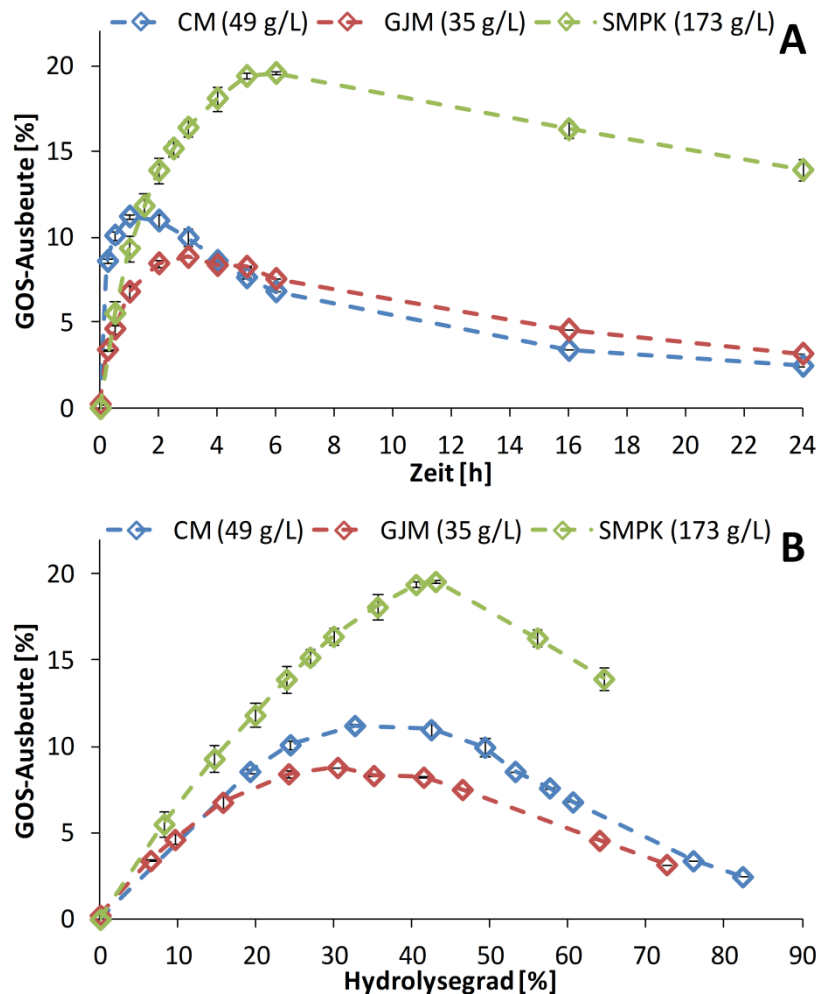
geschwindigkeit führen. Die Transgalactosylierungsaktivität wird jedoch nicht signifikant beeinflusst (maximale Ausbeute 24,5 % bei 200 g/L ILC, siehe Tabelle A.7-14).



**Abbildung 4-14:** GOS-Ausbeute mit  $\beta$ -Galactosidase aus *A. oryzae* (optilactase A50) in Sauermolke (ILC 39 g/L) und konzentrierter Sauermolke (ILC 100–200 g/L) in Abhängigkeit von der Reaktionszeit (A) und dem Lactoseumsatz (B). Reaktionsbedingungen: pH 4,5, 55°C, 50 U/g,  $n = 2$ . Sauermolke rekonstituiert aus Pulver (Euroduna Food Ingredients GmbH). Legende gibt die ILC (gerundet) wieder, tatsächliche Werte siehe Tabelle A.7-8. GOS-Analytik nur auf der Hi-Plex Na-Säule für ILC = 100 g/L, d. h. die angegebene Ausbeute enthält keine Disaccharide.

Im Unterschied zu den bisher beschriebenen Molken enthält die Sauermolke aus der Griechischen Joghurt-Herstellung Galactose. Gleiches gilt für das in dieser Arbeit eingesetzte Sauermolken-permeat-Konzentrat (Tabelle 4-2). Wie Yin et al. [126] zeigen konnten, wirkt Galactose stark inhibierend auf die  $\beta$ -Galactosidase aus *A. oryzae* und dessen Anwesenheit zu Beginn der Reaktion resultierte demzufolge in einer verminderten GOS-Ausbeute. Dies wird auch anhand der vorliegenden Ergebnisse deutlich (Abbildung 4-15). Während mit der galactosefreien Caseinmolke (49 g/L ILC) diesselbe Ausbeute (11,2 %) wie in der rekonstituierten Sauermolke (39 g/L ILC, Abbildung 4-14) erreicht werden konnte, ergab die Synthese in Griechischer Joghurt-Molke (35 g/L ILC) eine signifikant niedrigere GOS-Ausbeute von 8,8 % (siehe auch Tabelle A.7-14). Auch wird das Maximum zu einem späteren Zeitpunkt (3 h) erreicht als beispielsweise in Caseinmolke (1 h). Dies ist auf den ebenfalls verminderten Lactoseumsatz (siehe Abbildung A.7-26) zurückzuführen, welcher aus der

kompetitiven Inhibitorwirkung von Galactose resultiert. Der Anteil der umgesetzten Lactose am Ausbeutemaximum ist mit ca. 30 % etwas geringer, aber vergleichbar zu dem Ergebnis in Caseinmolke (33 %) und kann auf die geringe Anfangslactosekonzentration zurückgeführt werden.



**Abbildung 4-15:** GOS-Ausbeute mit  $\beta$ -Galactosidase aus *A. oryzae* (Maxilact A4) in Abhängigkeit von der Reaktionszeit (A) und dem Lactoseumsatz (B) in verschiedenen Sauermolke-Proben (CM = Caseinmolke, GJM = Griechische Joghurt-Molke, SMPK = Sauermolkenpermeat-Konzentrat). Reaktionsbedingungen: 55°C, 50 U/g, n = 2. Angabe der ILC in Klammern bezieht sich auf die tatsächliche Konzentration nach Zugabe der Enzymlösung. GOS-Analytik nur auf der Hi-Plex Na-Säule.

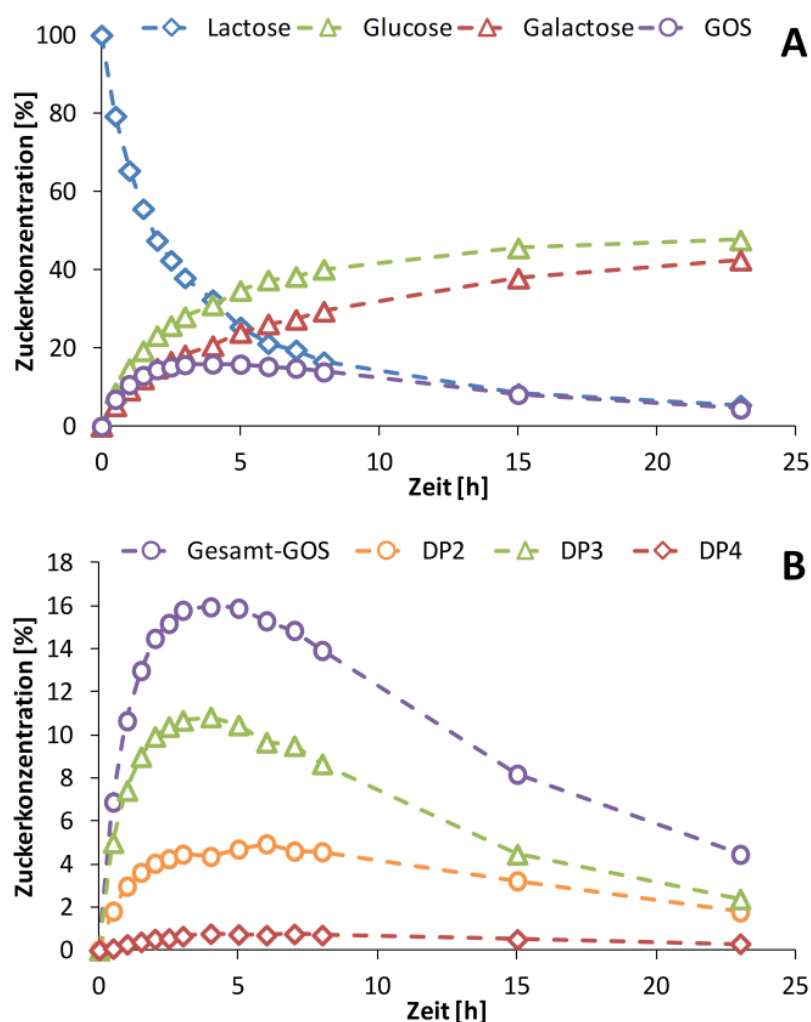
Besonders deutlich wird der negative Einfluss von Galactose in dem Sauermolkenpermeat-Konzentrat. Dieses weist mit 173 g/L eine deutlich höhere Anfangslactosekonzentration auf als die unkonzentrierten Molken. Wie zuvor gezeigt wurde, ist Molke sowie Molkenkonzentrat prinzipiell hervorragend für die GOS-Synthese mit *A. oryzae* geeignet, da dieses Enzym nicht wesentlich von ihren Bestandteilen beeinflusst wird. Demnach wäre bei einer ILC von 173 g/L eine Ausbeute von ca. 22,6 % zu erwarten. Mit dem beschriebenen Konzentrat wurde jedoch nur eine Ausbeute von 19,6 % erzielt. Auch hier ist im Vergleich zu Caseinmolke eine verzögerte GOS-Synthese zu beobachten (Abbildung 4-15A), welche durch die kompetitive Hemmung des Lactoseabbaus bedingt ist (Abbildung A.7-26). Dieser auf den jeweiligen Anfangslactosegehalt bezogene, prozentuale Lactoseumsatz ähnelt sich stark für die beiden galactosehaltigen Sauermolken. Grund ist ein

vergleichbares molares Inhibitor/Substrat-Verhältnis (d. h. Galactose/Lactose-Verhältnis) zu Reaktionsbeginn, welches für die Abtropfmolke 0,48 (8,9 g/L Galactose) und für das Konzentrat 0,39 (35,3 g/L Galactose) beträgt.

### 4.3.3 Synthese mit $\beta$ -Galactosidase aus *L. bulgaricus* LB4

#### 4.3.3.1 Synthese in Puffer

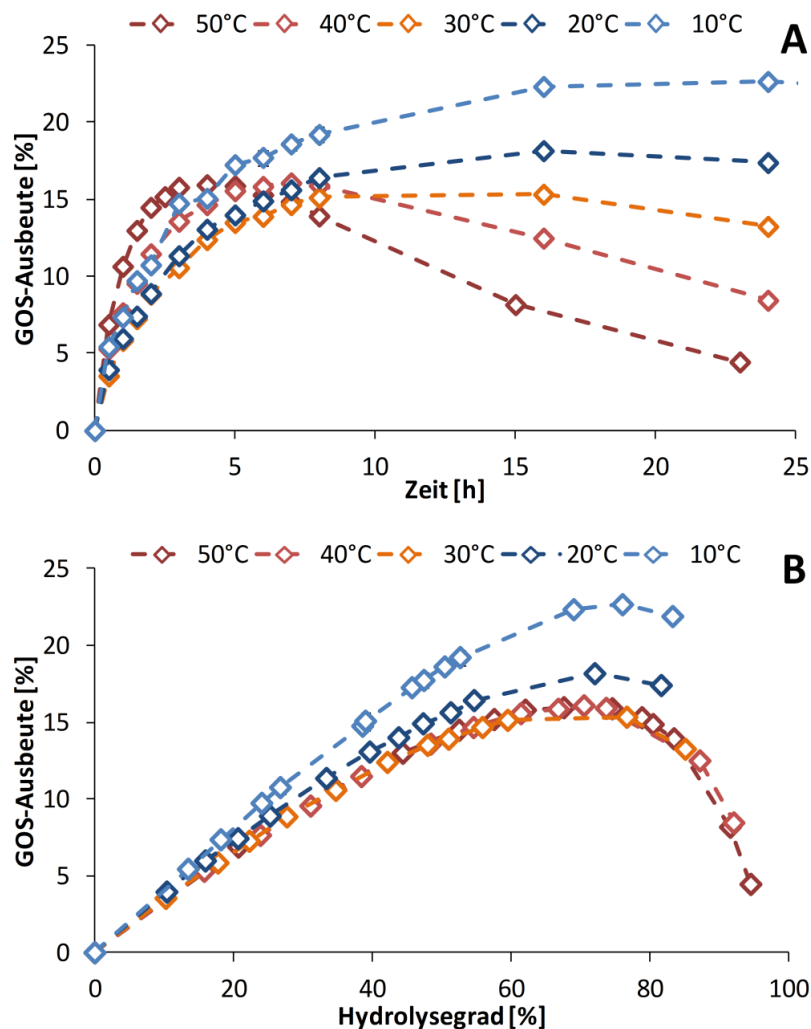
Von den zuvor charakterisierten *Lactobacillus*-Lactasen wurde das Enzym aus *L. bulgaricus* LB4 zur Beurteilung der GOS-Syntheseleistung ausgewählt. Eine extern durchgeführte Analyse der Aminosäuresequenz ergab eine 100 %-ige Übereinstimmung mit der  $\beta$ -Galactosidase aus *L. bulgaricus* ATCC 11842 (siehe Anhang 7.3.5). Die Ergebnisse sind somit direkt mit denen von Nguyen et al. [72] und Vasiljevic & Jelen [134] vergleichbar.



**Abbildung 4-16:** GOS-Synthese mit  $\beta$ -Galactosidase aus *L. bulgaricus* LB4 (Rohextrakt) in 50 mmol/L N-Phosphat-Puffer in Abhängigkeit von der Reaktionszeit. A: Substratverbrauch und Produktbildung. B: Bildungskinetik der einzelnen GOS-Fractionen (DP = Polymerisationsgrad). Reaktionsbedingungen: ILC 45 g/L, pH 6,5, 50°C, 30 U/g.

Es sei zunächst der Lactoseabbau sowie die Produktbildung bei einer Reaktionstemperatur von 50°C betrachtet (Abbildung 4-16). Die GOS-Ausbeute liegt bei ca. 16 %, wobei Trisaccharide mit einen

Anteil von knapp 70 % die Hauptfraktion bilden. Auch Monosaccharide können von diesem Enzym als Akzeptormoleküle genutzt werden, sodass etwa 25 % auf Disaccharid-GOS und nur ein geringer Anteil (< 5 %) auf Tetrasaccharid-GOS entfällt (siehe auch Abbildung 4-18). Wie in Abbildung 4-16A ersichtlich, entstehen während der Reaktion auch erhebliche Mengen an Galactose (ca. 20 % der Gesamtzucker am Ausbeutemaximum), was auf eine hohe hydrolytische Aktivität des Enzyms hindeutet. Dies wird auch anhand des GOS/Gal- bzw. Glc/Gal-Verhältnisses deutlich, welches mit 0,8 bzw. 1,5 als niedrig einzustufen ist. Die Ergebnisse stimmen sehr gut mit den Daten von Vasiljevic & Jelen [134] überein, welche eine Ausbeute von 16,7 %, ein GOS/Gal-Verhältnis von 0,8 und einen Glc/Gal-Faktor von 1,9 unter ähnlichen Bedingungen erhielten (Milchsalze-Puffer, 50 g/L ILC, 50°C, Hydrolysegrad 73 %). Sie ermittelten jedoch eine etwas andere GOS-Zusammensetzung von ca. 43 % DP2, 45 % DP3 und 12 % DP4, was auf unterschiedliche Analysenmethoden zurückgeführt werden kann. Die hier dargestellten GOS-Ausbeuten wurden nur aus den Analysen mit der Hi-Plex Na-Säule ermittelt, welche nur einen Teil der GOS-Disaccharide von Lactose trennt, sodass deren Anteil an den Gesamt-GOS durchaus höher liegen kann.



**Abbildung 4-17:** Einfluss der Temperatur auf die GOS-Synthese mit  $\beta$ -Galactosidase aus *L. bulgaricus* LB4 (Rohextrakt) in 50 mmol/L Na-Phosphat-Puffer in Abhängigkeit von der Reaktionszeit (A) und dem Lactoseumsatz (B). Reaktionsbedingungen: ILC 45 g/L, pH 6,5, 30 U/g,  $t = 23-24$  h für 20–50°C,  $t = 31$  h für 10°C,  $n = 2$  für 10°C und 20°C,  $n = 1$  für 30–50°C. Für den Lactoseabbau siehe Abbildung A.7-27A im Anhang.

Des Weiteren wurde die Temperaturabhängigkeit der GOS-Ausbeute im Bereich von 10–50°C untersucht (Abbildung 4-17). Mit abnehmender Synthesetemperatur verschiebt sich die maximale Ausbeute zu höheren Reaktionszeiten, was auf den langsameren Lactoseabbau (siehe Abbildung A.7-27) zurückzuführen ist. Im Temperaturbereich von 30–50°C wird die Gesamtausbeute nicht beeinflusst (Tabelle 4-8), demgegenüber ist bei 10°C und 20°C eine deutliche Ausbeutesteigerung auf bis zu 23 % zu beobachten. Das Maximum wird unabhängig von der Temperatur bei 70–80 % Hydrolysegrad erreicht (Abbildung 4-17B). Demnach ist insgesamt eine Steigerung der Transgalactosylierungsaktivität bei niedrigen Temperaturen zu beobachten, was auch anhand höherer GOS/Gal- bzw. Glc/Gal-Faktoren deutlich wird (Tabelle 4-8).

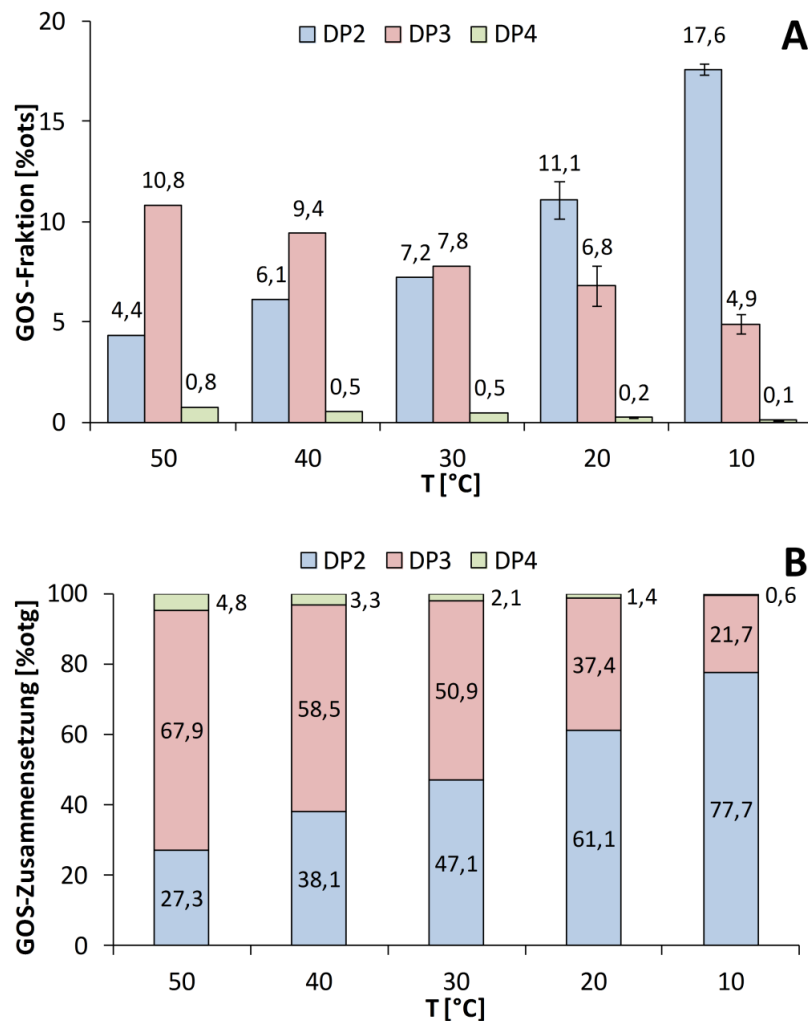
Diese Ergebnisse stehen nur in scheinbarem Widerspruch zu Vasiljevic & Jelen [134], welche den Bereich von 30–60°C untersuchten und das Ausbeutemaximum bei 50°C bestimmten. Im Vergleich dazu sank die Ausbeute bei 60°C, 40°C bzw. 30°C entsprechend um ca. 7 %, 20 % bzw. 37 %. Während die verminderte Ausbeute bei 60°C mit beginnender Enzymdenaturierung begründet werden kann, ist hingegen die (scheinbare) Ausbeuteminderung bei den niedrigeren Temperaturen auf eine zu kurz gewählte Reaktionszeit (max. 2 h) zurückzuführen. Dafür spricht auch der niedrigere Lactoseumsatz von 47 % bzw. 43 % bei diesen Temperaturen. Demgegenüber detektierten Nguyen et al. [72] nur einen marginalen Temperatureinfluss auf die GOS-Ausbeute im Bereich von 30–50°C, was mit den hier dargestellten Ergebnissen konform ist. Allerdings ermittelten sie die Maximalausbeute bei ca. 90–95 % Lactoseumsatz, was möglicherweise (analog zu *A. oryzae*) auf die höhere ILC von ca. 200 g/L zurückzuführen ist. Generell wird jedoch nur ein Anteil von etwa 20–30 % der Lactose zu GOS umgesetzt (Tabelle 4-8), was mit einer Vielzahl von publizierten Ergebnissen mit *Lactobacillus*-Lactasen (vgl. Tabelle A.7-4) übereinstimmt.

**Tabelle 4-8:** Zusammensetzung der Reaktionslösung in % der Gesamtzucker und Transgalactosylierungsaktivität (GOS/Gal-, Glc/Gal- bzw. GOS/reacLac-Faktor) von  $\beta$ -Galactosidase aus *L. bulgaricus* LB4 zum Zeitpunkt maximaler GOS-Ausbeute in Abhängigkeit von der Reaktionstemperatur in Puffer.

Reaktionstemp.	10°C	20°C	30°C	40°C	50°C
Glucose [%]	35,4	33,6	36,3	32,9	31,0
Galactose [%]	18,0	20,3	25,0	21,5	20,6
Lactose [%]	23,9	27,9	23,3	29,5	32,4
Gesamt-GOS [%]	22,7	18,2	15,3	16,1	16,0
GOS/Gal [-]	1,3	0,9	0,6	0,7	0,8
Glc/Gal [-]	2,0	1,6	1,4	1,5	1,5
GOS/reacLac [-]	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2

Bei Betrachtung der Ausbeute der einzelnen GOS-Fractionen (Di-, Tri- und Tetrasaccharide) wird deutlich, dass die erhöhte Gesamtausbeute bei niedrigen Temperaturen auf eine gesteigerte Synthese von GOS-Disacchariden zurückzuführen ist, deren Menge exponentiell ( $R^2 = 0,975$ ) zunimmt (Abbildung 4-18A). Gleichzeitig werden jedoch weniger Tri- und Tetrasacchariden synthetisiert, was zu einer deutlich veränderten Zusammensetzung der GOS-Mischung führt (Abbildung 4-18B). Diese Veränderung der Akzeptor-Präferenz von Di- zu Monosacchariden könnte durch eine temperaturbe-

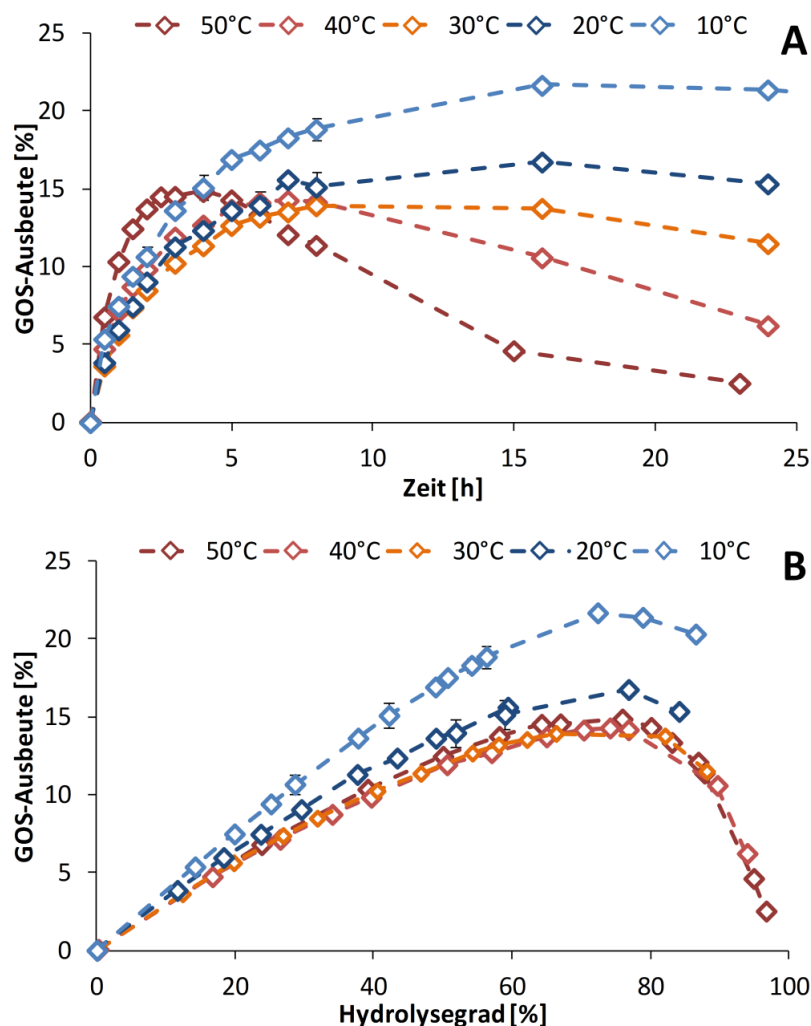
dingte Konformationsänderung am aktiven Zentrum erklärt werden. Interessiert nur der Anteil an  $\text{GOS} \geq \text{DP } 3$ , so wirkt sich also eine Absenkung der Reaktionstemperatur nachteilig auf die GOS-Ausbeute aus. Andererseits kann durch Auswahl einer bestimmten Reaktionstemperatur die GOS-Zusammensetzung gezielt modifiziert bzw. eingestellt werden. Demgegenüber wurde mit einer  $\beta$ -Galactosidase aus *L. reuteri* ein positiver Einfluss der Reaktionstemperatur auf die GOS-Ausbeute ermittelt (27 % GOS bei 17°C, 38 % GOS bei 30° und 37°C), die GOS-Zusammensetzung änderte sich jedoch nicht [96, 129, 182].



**Abbildung 4-18:** Menge der gebildeten GOS-Fractionen DP2, DP3 und DP4 (A, % der Gesamtzucker) und Anteil der Fractionen an den Gesamt-GOS (B) in Abhängigkeit von der Synthesetemperatur. Reaktionsbedingungen: ILC 45 g/L, 50 mmol/L Na-Phosphat-Puffer pH 6,5, 30 U/g, n = 2 für 10°C und 20°C, n = 1 für 30–50°C, DP = Polymerisationsgrad.

#### 4.3.3.2 Synthese in Süßmolke

Die GOS-Synthese in Süßmolke verhält sich grundsätzlich ähnlich wie in Puffer (Abbildung 4-19). Während die Reaktionstemperatur zwischen 30°C und 50°C keinen Einfluss hat, nimmt die GOS-Ausbeute bei 10°C deutlich zu. Auch die Temperaturabhängigkeit der gebildeten GOS-Fractionen ist analog zum Puffersystem (siehe Abbildung A.7-28).



**Abbildung 4-19:** Einfluss der Temperatur auf die GOS-Synthese mit  $\beta$ -Galactosidase aus *L. bulgaricus* LB4 (Rohextrakt) in Süßmolke in Abhängigkeit von der Reaktionszeit (A) und dem Lactoseumsatz (B). Reaktionsbedingungen: ILC 45 g/L, pH 6,5, 30 U/g,  $t = 23\text{--}24$  h für  $20\text{--}50^\circ\text{C}$ ,  $t = 31$  h für  $10^\circ\text{C}$ ,  $n = 2$  für  $10^\circ\text{C}$  und  $20^\circ\text{C}$ ,  $n = 1$  für  $30\text{--}50^\circ\text{C}$ , Süßmolke rekonstituiert aus Pulver (Milchwerke "Mittelelbe" GmbH). Für den Lactoseabbau siehe Abbildung A.7-27B im Anhang.

Insgesamt ist die Transgalactosylierungsaktivität jedoch leicht verringert, was in etwas geringeren Ausbeuten resultiert (Tabelle 4-9). Es ist somit bei Verwendung von Süßmolke als Synthesemedium mit etwa 4–11 % Ausbeuteverlust (entspricht ca. 0,4–0,8 g/L) zu rechnen. Die hohe Analogie der GOS-Synthese-Kinetik (Abbildung 4-17A und Abbildung 4-19A) zeigt jedoch prinzipiell eine gute Eignung dieses Enzyms für das Substrat Molke, da dessen Stabilität praktisch nicht beeinflusst wird. Dies ist konform mit den diesbezüglich durchgeführten Untersuchungen (siehe Abbildung A.7-19B). Somit lassen sich in Puffer gewonnene Erkenntnisse weitestgehend auf das System Molke übertragen. Literaturdaten für die GOS-Synthese mit *L. bulgaricus* in Molke liegen bislang nicht vor. Analog zu den dargestellten Ergebnissen war die Ausbeute in Milch gegenüber einem Milchsalt-Puffer jedoch ebenfalls verringert (16,7 % vs. 10,1 %) [134]. Im Gegensatz zu Molke (siehe Abbildung A.7-28) konnte mit dem Substrat Milch auch eine Beeinflussung der gebildeten GOS-Strukturen beobachtet werden (deutlich weniger Tri- und keine Tetrasaccharide in Milch).

**Tabelle 4-9:** Zusammensetzung der Reaktionslösung in % der Gesamtzucker und Transgalactosylierungsaktivität (GOS/Gal-, Glc/Gal- bzw. GOS/reacLac-Faktor) von  $\beta$ -Galactosidase aus *L. bulgaricus* LB4 zum Zeitpunkt maximaler GOS-Ausbeute in Abhängigkeit von der Reaktionstemperatur in Süßmolke.

Reaktionstemp.	10°C	20°C	30°C	40°C	50°C
Glucose [%]	33,5	35,9	31,1	34,9	35,8
Galactose [%]	17,1	24,1	21,3	24,9	25,2
Lactose [%]	27,7	23,2	33,7	25,9	24,2
Gesamt-GOS [%]	21,7	16,7	13,9	14,3	14,8
GOS/Gal [-]	1,3	0,7	0,7	0,6	0,6
Glc/Gal [-]	2,0	1,5	1,5	1,4	1,4
GOS/reacLac [-]	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2

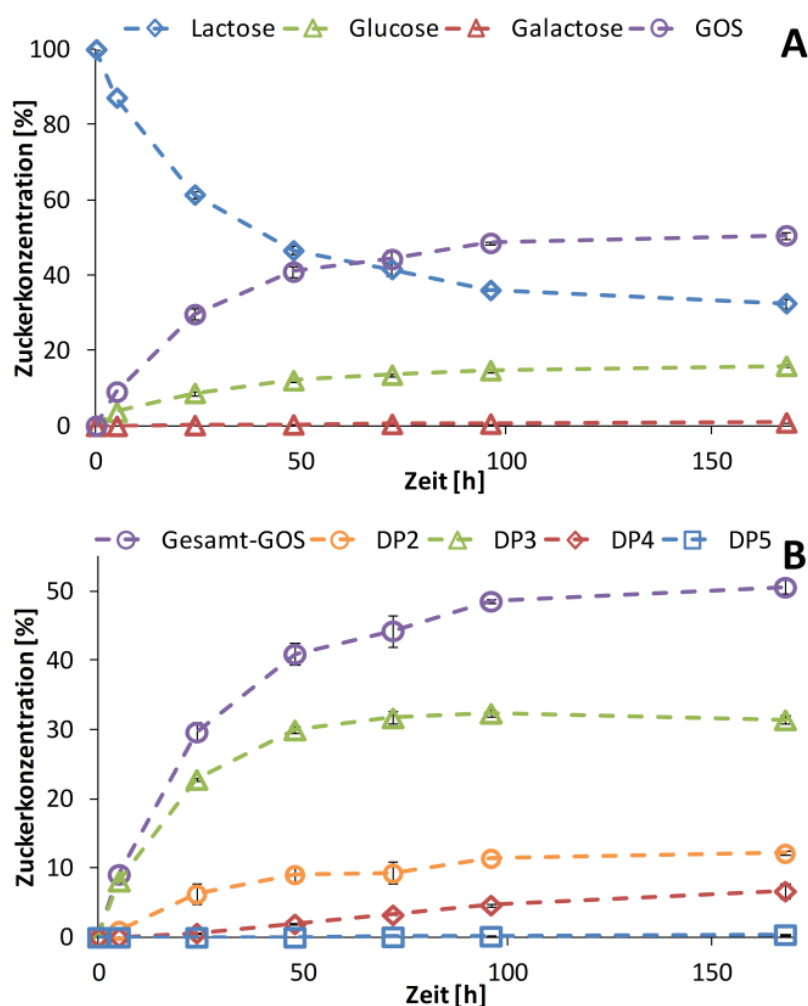
#### 4.3.4 Synthese mit *C. laurentii*-Zellen

##### 4.3.4.1 Synthese in Puffer

Die *C. laurentii*- $\beta$ -Galactosidase besitzt mit einer GOS-Ausbeute von ca. 50 % eine sehr hohe Transgalactosylierungsaktivität (Abbildung 4-20). Auffällig ist auch die äußerst niedrige Konzentration an freigesetzter Galactose von max. 0,9 % nach 168 h. Letzteres weist darauf hin, dass die vom Enzym umgesetzte Lactose fast ausschließlich zu GOS umgewandelt wird. Die Affinität dieser  $\beta$ -Galactosidase Galactose nicht auf Wasser, sondern auf ein anderes Zuckermolekül zu übertragen, ist demnach sehr hoch. Dies wird auch durch den daraus resultierenden GOS/Gal-Faktor von 56 bestätigt.

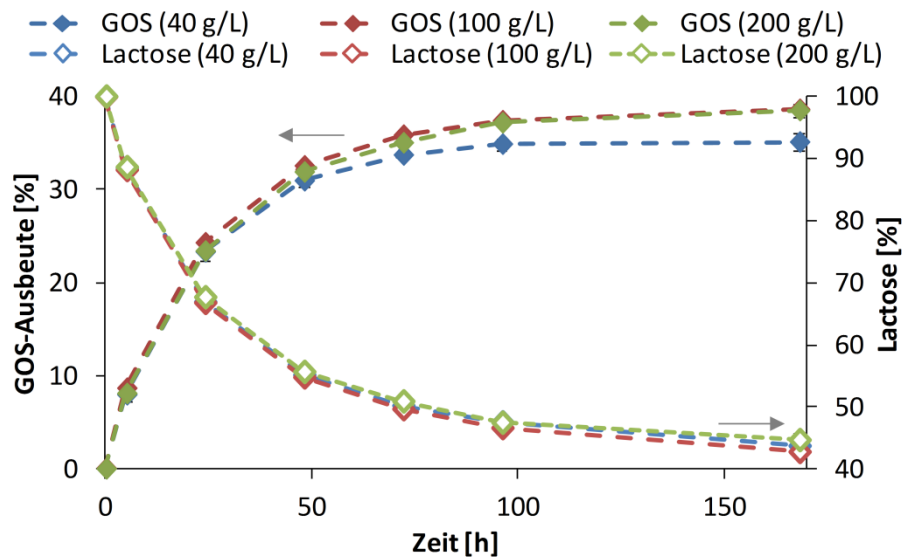
Mit ca. 30 % (entspricht etwa 62 % der Gesamt-GOS) machen Trisaccharide die größte GOS-Fraktion aus (Abbildung 4-20B). Dies stimmt mit Literaturangaben überein [65]. Knapp 25 % aller GOS sind Disaccharide, 13 % entfallen auf Tetrasaccharide und ein kleiner Anteil (0,7 % der Gesamt-GOS) Pentasaccharide wurde ebenfalls detektiert.





**Abbildung 4-20:** GOS-Synthese mit *C. laurentii*-Zellen in 50 mmol/L Mcllvaine-Puffer in Abhängigkeit von der Reaktionszeit. A: Substratverbrauch und Produktbildung. B: Bildungskinetik der einzelnen GOS-Fractionen (DP = Polymerisationsgrad). Reaktionsbedingungen: ILC 200 g/L, pH 4,5, 55°C, ca. 1 U/g, n=2.

Weiterhin wurde der Einfluss der anfänglichen Lactosekonzentration untersucht. Wie in Abbildung 4-21 zu sehen, hat diese nur einen geringen Einfluss auf die relative GOS-Ausbeute, der sich allenfalls bei sehr niedrigen Lactosekonzentrationen unterhalb von 40 g/L bemerkbar macht. Im ILC-Bereich von 40–200 g/L konnte jedoch kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Tabelle A.7-14). Der Lactoseumsatz ist mit 56–57 % nach 168 h ebenfalls unabhängig von der ILC. Die Transgalactosylierungsaktivität steigt mit zunehmender Anfangslactosekonzentration aufgrund der leichten Steigerung der Ausbeute (35,1 %, 38,6 % und 38,5 % ohne DP2-GOS bei 40 g/L, 100 g/L und 200 g/L ILC) und der gleichzeitigen Reduktion an freier Galactose (entsprechend 2,3 %, 1,3 % und 0,9 % des Gesamtzuckers). Somit ergeben sich GOS/Gal-Faktoren von 15, 29 und 42 für 40 g/L, 100 g/L und 200 g/L ILC. Der Anteil der einzelnen GOS-Fractionen an den Gesamt-GOS wird jedoch nicht beeinflusst (siehe Tabelle A.7-13).

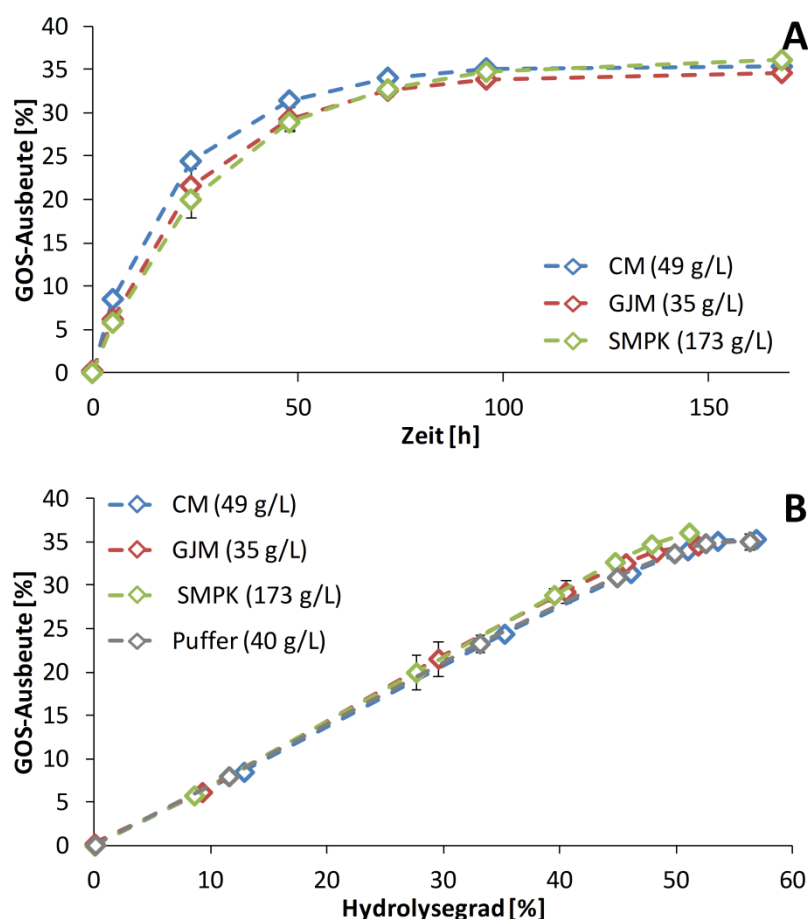


**Abbildung 4-21:** GOS-Ausbeute (links Achse) und Lactosekonzentration (rechte Achse) in Abhängigkeit von der Reaktionszeit bei Verwendung ganzer Zellen von *C. laurentii* unter Variation der anfänglichen Lactosekonzentration (40 g/L, 100 g/L und 200 g/L). Reaktionsbedingungen: 50 mmol/L McIlvaine-Puffer pH 4,5, 55°C, ca. 1 U/g, n = 2 für ILC 40 g/L und 200 g/L, n = 1 für ILC 100 g/L. GOS-Analytik nur auf der Hi-Plex Na-Säule.

Ohtsuka et al. [65] erhielten mit dem Stamm *C. laurentii* OKN-4 eine vergleichbare Ausbeute von ca. 43 % (DP2–DP4) bei 25 g/L ILC. Berücksichtigt man, dass etwa 24 % der gebildeten GOS Disaccharide sind (Abbildung 4-20B), so kann man eine Ausbeute von ca. 47 % bei 40 g/L ILC prognostizieren. Aufgrund des vermuteten stärkeren Einflusses der ILC bei sehr niedrigen Anfangskonzentrationen, kann also von einer sehr guten Übereinstimmung mit dem Literaturwert ausgegangen werden. Ebenso können stammspezifische Unterschiede, verschiedene Analysemethoden oder die Tatsache, dass in der vorliegenden Arbeit nicht mit einem freien, sondern mit einem zellwandgebundenen Enzym gearbeitet wurde, Grund für abweichende Ergebnisse sein.

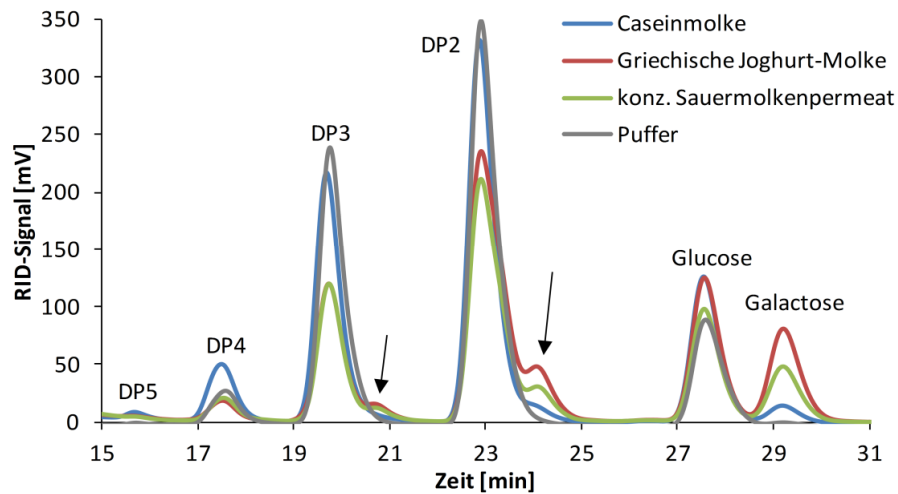
#### 4.3.4.2 Synthese in Sauermolke

Ähnlich wie zu den Ergebnissen in Puffer, zeigt sich auch im System Sauermolke keine Abhängigkeit der relativen Ausbeute von der Anfangslactosekonzentration (Abbildung 4-22). Die erzielten Ausbeuten liegen im Bereich von 34,6 % bis 36,1 % und entsprechen somit der Ausbeute in Puffer. Demnach beeinflussen die Molken Salze und -proteine in ihrer Summe das Enzym in seiner Neigung zur GOS-Synthese nicht, trotz des negativen Effekts einzelner Ionen auf die Enzymaktivität (Tabelle 4-3). Ebenso wirkt sich eine deutliche Erhöhung der Effektkonzentration (so im konzentrierten Sauermolkenpermeat) nicht auf Transgalactosylierungs- oder Hydrolyseaktivität aus (Abbildung 4-22B), sodass dieses Enzym auch hervorragend in konzentrierten Molken eingesetzt werden kann. Zu bemerken ist, dass sowohl das Konzentrat, als auch produktionsbedingt die Griechische Joghurt-Molke, beachtliche Gehalte an Galactose (35,3 g/L bzw. 8,9 g/L unter Einbeziehung der Verdünnung durch die Enzymzugabe) aufweisen. Aufgrund des innerhalb des Untersuchungszeitraums etwas geringeren Lactoseumsatzes in den galactosehaltigen Molken (Hydrolysegrad nach 168 h ca. 51,5 % im Vergleich zu 57 % in Caseinmolke, siehe auch Abbildung A.7-29), kann davon ausgegangen werden, dass Galactose als (kompetitiver) Inhibitor wirkt. Die Inhibitorwirkung ist jedoch geringer ausgeprägt als bei *A. oryzae* (vgl. Abbildung A.7-26).



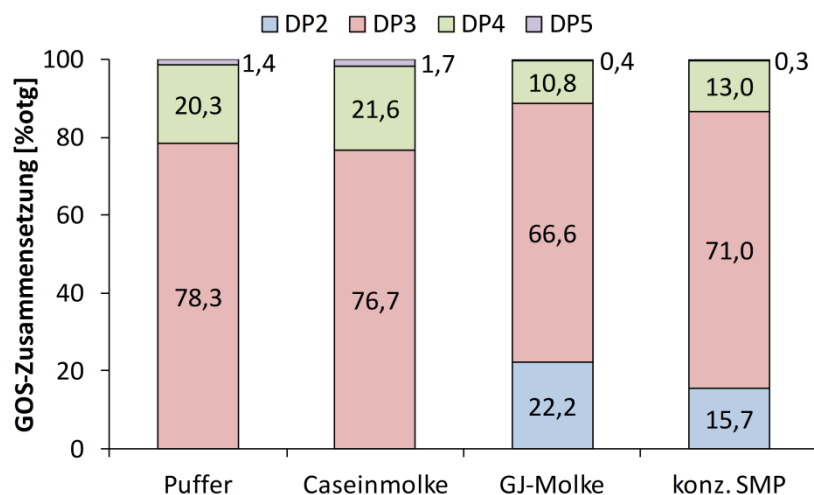
**Abbildung 4-22:** GOS-Ausbeute in Abhängigkeit von der Reaktionszeit (A) und dem Lactoseumsatz (B) bei Verwendung ganzer Zellen von *C. laurentii* in verschiedenen Sauermolke-Proben (CM = Caseinmolke, GJM = Griechische Joghurt-Molke, SMPK = Sauermolkenpermeat-Konzentrat) und Puffer (nur in B). Reaktionsbedingungen: 55°C, ca. 1 U/g, n = 2. Angabe der ILC in Klammern bezieht sich auf die tatsächliche Konzentration nach Zugabe der Zellschlüsselung. GOS-Analytik nur auf der Hi-Plex Na-Säule.

Der anfängliche Galactose-Gehalt hat aber nicht nur Einfluss auf die Lactoseumsatzgeschwindigkeit, sondern auch auf die GOS-Zusammensetzung. Im HPLC-Chromatogramm (Abbildung 4-23) erscheint bei den beiden galactosehaltigen Molken ein zweiter Disaccharid-Peak bei ca. 24 min, analog ein zweiter Trisaccharid-Peak bei ca. 20,5 min. Dies legt nahe, dass Galactose von *C. laurentii* als Akzeptormolekül genutzt werden kann und somit Di-Galactosen entstehen, welche sich in ihrer Retentionszeit leicht von Lactose bzw. Galactose-Glucose-GOS wie z. B. Allolactose unterscheiden. Folglich können so auch Tri-Galactosen gebildet werden, welche ebenfalls etwas später als die anderen Trisaccharide (Galactosyllactosen bei ca. 19,5 min) eluieren. In Puffer ist der Di-Galactose-Peak nicht vorhanden, da das Enzym selbst aufgrund seiner hohen Transferaktivität nur wenig Galactose freisetzt (Abbildung 4-20), sodass andere Zuckermoleküle als Akzeptor präferiert werden. Ebenso für die Synthese von Di-Galactosen spricht die Tatsache, dass die Galactosekonzentration mit zunehmender Reaktionszeit nicht wie zu erwarten ansteigt, sondern sogar um 31 % (von 8,9 g/L auf 6,1 g/L) in Griechischer Joghurt-Molke bzw. um 41 % (von 35,3 g/L auf 21,0 g/L) im Konzentrat sinkt.



**Abbildung 4-23:** HPLC-Chromatogramme (Säule: Hi-Plex Na) zum Zeitpunkt der maximalen GOS-Ausbeute in Puffer, Caseinmolke, Griechischer Joghurt-Molke und konzentriertem Sauermolkenpermeat, DP = Polymerisationsgrad. Pfeile markieren Unterschiede zwischen galactosefreien und galactosehaltigen Ausgangslösungen. Modifizierte Version dieser Abbildung publiziert als Fig. 5A in [CF1].

Somit hat die Verwendung galactosehaltiger Substrate Einfluss auf die anteilige Synthese der einzelnen GOS-Fractionen (Abbildung 4-24). Während in beiden Fällen Trisaccharide mit 67–78 % die mengenmäßig größte Fraktion darstellen, ist die Synthese von GOS  $\geq$  DP4 in den galactosehaltigen Sauermolken zu Gunsten der Disaccharide deutlich vermindert. Grund hierfür ist die zusätzliche Nutzung von Galactose als Akzeptor und folglich eine geringerer Synthese von Tri- und daraus resultierend auch Tetrasacchariden. Dennoch sind auch diese Sauermolkeprodukte grundsätzlich gut für die GOS-Synthese mit dem *C. laurentii*-Enzym geeignet, zudem ist die Strukturdiversität des Endproduktes durch die Bildung von Di-, Tri- und möglicherweise Tetra-Galactosen erhöht.



**Abbildung 4-24:** Anteil der Fraktionen an den Gesamt-GOS in Abhängigkeit vom verwendeten Substrat (GJ-Molke = Griechische Joghurt-Molke, konz. SMP = konzentriertes Sauermolkenpermeat) bei der GOS-Synthese mit *C. laurentii*, DP = Polymerisationsgrad.

### 4.3.5 Vergleich der untersuchten Enzyme und Substrate

Im folgenden Abschnitt soll die GOS-Syntheseleistung aller verwendeten  $\beta$ -Galactosidasen in den Substraten Puffer, Süß- und Sauermolke miteinander verglichen werden. Für den Vergleich der konzentrierten Molken sei auf Tabelle A.7-14 verwiesen.

**Tabelle 4-10:** GOS-Ausbeute und -Zusammensetzung (Mittelwerte aus  $n = 2$ ,  $n = 1$  für *L. bulgaricus* bei 50°C) in Puffer in Abhängigkeit von der Enzymquelle, n. d. = nicht detektiert, DP = Polymerisationsgrad, DH = Lactosehydrolysegrad zum Zeitpunkt maximaler GOS-Ausbeute.

Enzymquelle	<i>K. lactis</i>	<i>A. oryzae</i>	<i>L. bulgaricus</i>	<i>L. bulgaricus</i>	<i>C. laurentii</i>
<b>Reaktionsbedingungen</b>					
ILC [g/L]	38	38	45	45	40
Puffer	50 mmol/L PEM	deion. Wasser	50 mmol/L Na-Phosphat	50 mmol/L Na-Phosphat	50 mmol/L McIlvaine
pH	6,5	4,5	6,5	6,5	4,5
T [°C]	45	55	10	50	55
E/S [U/g <sub>Lactose</sub> ]	50	50	30	30	1
t [h] <sup>a</sup>	0,5	1,0	24,0	4,0	168,0
<b>Zusammensetzung der Reaktionslösung am Ausbeutemaximum</b>					
Glucose [%]	42,7	13,1	35,4	31,0	18,8
Galactose [%]	37,7	8,6	18,0	20,6	2,3
Lactose [%]	8,6	67,3	23,9	32,4	43,7
Gesamt-GOS [%] <sup>b</sup>	10,9	10,9	22,7 <sup>c</sup>	16,0 <sup>c</sup>	35,1 <sup>c</sup>
GOS $\geq$ DP3 [%] <sup>b</sup>	4,5	10,2	5,0	11,6	35,1
DP2-GOS [%] <sup>d</sup>	6,4 (58)	0,7 (6)	17,6 (78)	4,4 (27)	n. d.
DP3-GOS [%] <sup>d</sup>	4,5 (42)	9,5 (87)	4,9 (22)	10,8 (68)	27,5 (78)
DP4-GOS [%] <sup>d</sup>	n. d.	0,7 (6)	0,1 (1)	0,8 (5)	7,1 (20)
DP5-GOS [%] <sup>d</sup>	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,5 (1)
<b>Hydrolyse- und Transgalactosylierungsaktivität, spezifische Produktivität</b>					
DH [%]	91,4	32,7	76,1	67,6	56,3
Glc/Gal [-]	1,1	1,5	2,0	1,5	8,1
GOS/reacLac [-]	0,1	0,3	0,3	0,2	0,6
GOS/Gal [-]	0,3	1,3	1,3	0,8	15,1
$\pi_{E,t}$ [mgGOS/U·h] <sup>e</sup>	4,4	2,2	0,3	1,3	2,2

<sup>a</sup> Zeitpunkt maximaler GOS-Ausbeute. <sup>b</sup> entspricht der GOS-Ausbeute bezogen auf die Anfangslactosekonzentration.

<sup>c</sup> Analytik nur auf Hi-Plex Na-Säule, d. h. GOS-Disaccharide sind mglw. nicht vollständig erfasst. <sup>d</sup> Werte in Klammern geben den Anteil der jeweiligen Fraktion an den Gesamt-GOS in % an. Durch Rundung Abweichung von 100 % möglich. <sup>e</sup> bezogen auf Gesamt-GOS-Ausbeute.

Anhand Tabelle 4-10 wird deutlich, dass die *C. laurentii*- $\beta$ -Galactosidase die höchste Transgalactosylierungsaktivität aufweist. Etwa 60 % der umgesetzten Lactose reagiert zu GOS, was in einem GOS/Gal-Verhältnis von 15,1 bzw. Glc/Gal-Verhältnis von 8,1 resultiert. Dies ist in etwa vergleichbar mit dem kommerziell erhältlichen Enzym aus *B. circulans* [130]. *C. laurentii* liefert jedoch deutlich höhere Ausbeuten in Lactoselösungen geringer Konzentration (35 % zzgl. GOS-Disaccharide) als *B. circulans* (ca. 25 % bei 50 g/L ILC [147]). Sowohl *C. laurentii* als auch *L. bulgaricus* liefern unter den jeweils gewählten Reaktionsbedingungen höhere GOS-Ausbeuten als die Referenzenzyme aus *K. lactis* bzw. *A. oryzae*. Betrachtet man nur die als Ballaststoff auslobbaren GOS mit einem  $DP \geq 3$  [13], können mit *A. oryzae* und *L. bulgaricus* ähnliche Ausbeuten von ca. 10–12 % erzielt werden, jedoch nur etwa die Hälfte mit *K. lactis* (und *L. bulgaricus* bei 10°C) aufgrund der hohen Neigung, Monosaccharide als Galactosyl-Akzeptor zu nutzen. Die höchste Ausbeute (35 %) wird jedoch mit *C. laurentii* erhalten. Aufgrund der generell sehr hohen Transfer- und gleichzeitig niedrigen Hydrolyseaktivität stehen im Vergleich zu den anderen Enzymen nur wenige Monosaccharide als Akzeptormoleküle zur Verfügung, sodass vorrangig Galactosyllactosen und folglich Di-Galactosyllactosen gebildet werden. Der niedrigste Restlactosegehalt und damit gleichzeitig höchste Gehalt an Monosacchariden wird mit *K. lactis* erreicht, hingegen verbleiben bei der Synthese mit *A. oryzae* über 65 % der Lactose ungenutzt.

Um die GOS-Produktivität der verschiedenen Enzymquellen vergleichen zu können, wurde die spezifische Enzymproduktivität  $\pi_{E,t}$  herangezogen, da diese auf die eingesetzte Enzymmenge normiert und somit im Gegensatz zur volumetrischen Produktivität von dieser unabhängig ist. Um eine direkte Vergleichbarkeit zwischen den Enzymen gewährleisten zu können, wurde als Maß für die Enzymmenge die Menge eingesetzter Units (d. h. das E/S-Verhältnis) herangezogen, um Konzentrationsunterschiede im  $\beta$ -Galactosidase-Gehalt zwischen den verschiedenen Enzympräparaten auszugleichen. Die  $\beta$ -Galactosidase aus *K. lactis* weist mit 4,4 mgGOS/U·h die höchste Produktivität auf, gefolgt von *A. oryzae* und *C. laurentii* mit je 2,2 mgGOS/U·h.

In Süßmolke wird vor allem das Enzym aus *K. lactis* stark von den enthaltenen Milchsäuren und/oder Proteinen destabilisiert, sodass bei den gewählten Bedingungen nur eine geringe Ausbeute von ca. 4 % erhalten wird (Tabelle 4-11). Folglich ist auch die Enzymproduktivität mit 1,7 mgGOS/U·h niedriger als im Puffersystem. Bedingt durch die zeitige Inaktivierung verschiebt sich auch der Anteil an Di- und Trisacchariden an den Gesamt-GOS, da letztere vor allem zu Beginn der Reaktion gebildet werden. Die  $\beta$ -Galactosidase aus *A. oryzae* wird nicht, die aus *L. bulgaricus* nur gering vom umgebenden Medium beeinflusst. Trotz insgesamt etwas geringerer Ausbeuten im Vergleich zum Puffersystem, kann die GOS-Ausbeute bei Verwendung des *L. bulgaricus*-Enzyms im Vergleich zu *A. oryzae* verdoppelt werden, allerdings zu Lasten der Tri- und Tetrasaccharid-Fractionen (bei 10°C). Bei höheren Reaktionstemperaturen von 50°C ist die Ausbeute an GOS  $\geq DP3$  mit der von *A. oryzae* vergleichbar, die Gesamtausbeute mit knapp 15 % jedoch um den Faktor 1,3 höher. Somit ist  $\beta$ -Galactosidase aus *L. bulgaricus* hervorragend für die Synthese von GOS in Süßmolke geeignet. Zusätzlich lassen sich über die Reaktionstemperatur Gesamtausbeute und GOS-Zusammensetzung steuern.

**Tabelle 4-11:** GOS-Ausbeute und -Zusammensetzung (Mittelwerte aus  $n = 2$ ,  $n = 1$  für *L. bulgaricus* bei 50°C) in rekonstituierter Süßmolke in Abhängigkeit von der Enzymquelle, n. d. = nicht detektiert, DP = Polymerisationsgrad, DH = Lactosehydrolysegrad zum Zeitpunkt maximaler GOS-Ausbeute.

Enzymquelle	<i>K. lactis</i>	<i>A. oryzae</i>	<i>L. bulgaricus</i>	<i>L. bulgaricus</i>
<b>Reaktionsbedingungen</b>				
ILC [g/L]	38	38	45	45
pH	6,5	4,5	6,5	6,5
T [°C]	45	55	10	50
E/S [U/g <sub>Lactose</sub> ]	50	50	30	30
t [h] <sup>a</sup>	0,5	1,0	16,0	4,0
<b>Zusammensetzung der Reaktionslösung am Ausbeutemaximum</b>				
Glucose [%]	9,0	13,2	33,5	35,8
Galactose [%]	8,3	9,2	17,1	25,2
Lactose [%]	78,4	66,7	27,7	24,2
Gesamt-GOS [%] <sup>b</sup>	4,3	10,9	21,7 <sup>b</sup>	14,8 <sup>b</sup>
GOS ≥ DP3 [%] <sup>b</sup>	2,8	10,4	4,4	10,1
DP2-GOS [%] <sup>d</sup>	1,5 (34)	0,5 (5)	17,3 (80)	4,8 (32)
DP3-GOS [%] <sup>d</sup>	2,8 (66)	9,7 (89)	4,3 (20)	9,3 (63)
DP4-GOS [%] <sup>d</sup>	n. d.	0,7 (6)	0,1 (1)	0,8 (5)
<b>Hydrolyse- und Transgalactosylierungsaktivität, spezifische Produktivität</b>				
DH [%]	21,6	33,3	72,3	75,8
Glc/Gal [-]	1,1	1,4	2,0	1,4
GOS/reacLac [-]	0,2	0,3	0,3	0,2
GOS/Gal [-]	0,5	1,2	1,3	0,6
$\pi_{E,t}$ [mgGOS/U·h] <sup>e</sup>	1,7	2,2	0,5	1,2

<sup>a</sup> Zeitpunkt maximaler GOS-Ausbeute. <sup>b</sup> entspricht der GOS-Ausbeute bezogen auf die Anfangslactosekonzentration.

<sup>c</sup> Analytik nur auf Hi-Plex Na-Säule, d. h. GOS-Disaccharide sind mglw. nicht vollständig erfasst. <sup>d</sup> Werte in Klammern geben den Anteil der jeweiligen Fraktion an den Gesamt-GOS in % an. Durch Rundung Abweichung von 100 % möglich. <sup>e</sup> bezogen auf Gesamt-GOS-Ausbeute.

In Sauermolke liefern die beiden kommerziellen Enzyme aus *K. lactis* bzw. *A. oryzae* GOS-Ausbeuten von ca. 11 % (Tabelle 4-12). Demgegenüber generiert *C. laurentii* mit ca. 35 % in etwa die 3-fache Ausbeute. In Summe können mit allen drei Enzymen vergleichbare Ausbeuten wie in Puffer erreicht werden, sodass der Einfluss des umgebenden Mediums als nicht signifikant zu bewerten ist (Tabelle A.7-14). Die ermittelten Ausbeuten liegen zudem deutlich über der von *A. niger* (1,5 % bei 40 g/L ILC [179]). Weitere Daten zur GOS-Synthese in unkonzentrierter Sauermolke liegen bisher nicht vor. Eine besondere Art von Sauermolke ist die Abtropfmolke aus der Produktion von Griechischem Joghurt, da sie aufgrund der Stoffwechselaktivität der Starterkulturen einerseits eine geringere Lactosekonzentration aufweist, andererseits auch das für seine inhibierende Wirkung bekannte Monosaccharid Galactose enthält. Wie die Untersuchungen gezeigt haben, bewirkt letzteres bei

*A. oryzae* eine um etwa 20 % reduzierte GOS-Ausbeute mit einem geringeren Anteil an Tetra- und Pentasacchariden (Tabelle 4-12). Dagegen beeinflusst Galactose bei *C. laurentii* die GOS-Ausbeute nicht signifikant, wohl aber die GOS-Zusammensetzung. Aufgrund der Verfügbarkeit von Galactose als Akzeptorsubstrat, konkurriert dieses mit Lactose und es kommt zur vermehrten Bildung von Di-Galactosen und folglich weniger Galactosyllactosen. Aufgrund dessen nimmt die Konzentration an freier Galactose mit fortschreitender Reaktion ab, sodass sich die Faktoren GOS/Gal bzw. Glc/Gal nicht berechnen lassen. Die Ausbeute an Tri- und höheren Oligosacchariden reduziert sich in Folge von 35,4 % auf 26,9 %.

**Tabelle 4-12:** GOS-Ausbeute und -Zusammensetzung (Mittelwerte aus n = 2) in Sauermolke in Abhängigkeit von der Enzymquelle, n. d. = nicht detektiert, n. b. = nicht berechenbar, DP = Polymerisationsgrad, DH = Lactosehydrolysegrad zum Zeitpunkt maximaler GOS-Ausbeute.

Enzymquelle	<i>K. lactis</i>	<i>A. oryzae</i>	<i>C. laurentii</i>	<i>A. oryzae</i>	<i>C. laurentii</i>
<b>Reaktionsbedingungen</b>					
<b>Molke</b>	rekonst. Molke	Caseinmolke	Caseinmolke	GJ-Molke	GJ-Molke
<b>ILC [g/L]</b>	38	49	49	35	35
<b>pH</b>	6,5	4,6	4,6	4,3	4,3
<b>T [°C]</b>	45	55	55	55	55
<b>E/S [U/g<sub>Lactose</sub>]</b>	50	50	1	50	1
<b>t [h]<sup>a</sup></b>	2	1	168	3	168
<b>Zusammensetzung der Reaktionslösung am Ausbeutemaximum</b>					
<b>Glucose [%]</b>	30,4	12,9	19,1	11,3	20,2
<b>Galactose [%]</b>	29,1	8,5	2,3	26,2	13,8
<b>Lactose [%]</b>	30,0	67,4	43,2	55,5	38,4
<b>Gesamt-GOS [%]</b>	10,6	11,2 <sup>b</sup>	35,4 <sup>b</sup>	7,0 <sup>b</sup>	27,6 <sup>b</sup>
<b>GOS ≥ DP3 [%]</b>	5,5	11,2	35,4	7,0	21,4
<b>DP2-GOS [%]<sup>c</sup></b>	5,1 (48)	n. d.	n. d.	n. d.	6,1 (22)
<b>DP3-GOS [%]<sup>c</sup></b>	5,5 (52)	9,9 (88)	27,1 (77)	6,3 (90)	18,4 (67)
<b>DP4-GOS [%]<sup>c</sup></b>	n. d.	1,3 (11)	7,6 (22)	0,7 (10)	3,0 (11)
<b>DP5-GOS [%]<sup>c</sup></b>	n. d.	< 0,1 (0)	0,6 (2)	< 0,1 (0)	0,1 (0)

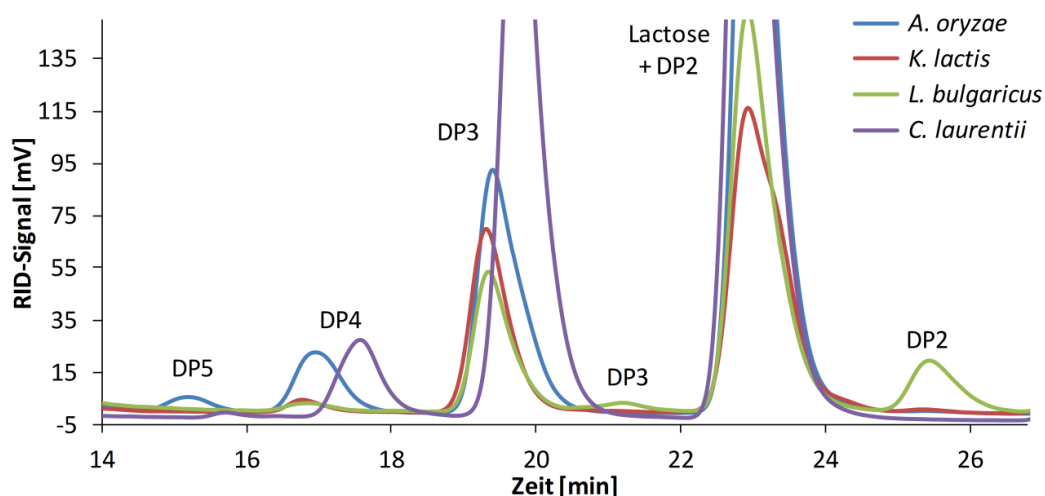


Tabelle 4-12 (Fortsetzung)

Enzymquelle	<i>K. lactis</i>	<i>A. oryzae</i>	<i>C. laurentii</i>	<i>A. oryzae</i>	<i>C. laurentii</i>
Hydrolyse- und Transgalactosylierungsaktivität, spezifische Produktivität					
$Y_{\text{GOS}} [\%]^d$	10,6	11,2	35,4	8,8	34,6
$Y_{\text{GOS} \geq \text{DP3}} [\%]^d$	5,5	11,2	35,4	8,8	26,9
DH [%]	70,0	32,6	56,8	27,9	51,6
Glc/Gal [-]	1,0	1,5	8,3	2,0 <sup>e</sup>	n. b.
GOS/reacLac [-]	0,2	0,3	0,6	0,3	0,7
GOS/Gal [-]	0,4	1,3	15,3	1,4 <sup>e</sup>	n. b.
$\pi_{\text{E,t}} [\text{mgGOS}/\text{U} \cdot \text{h}]^f$	1,1	2,2	2,2	0,6	2,2

<sup>a</sup> Zeitpunkt maximaler GOS-Ausbeute. <sup>b</sup> Analytik nur auf Hi-Plex Na-Säule, d. h. GOS-Disaccharide sind mglw. nicht vollständig erfasst. <sup>c</sup> Werte in Klammern geben den Anteil der jeweiligen Fraktion an den Gesamt-GOS in % an. Durch Rundung Abweichung von 100 % möglich. <sup>d</sup> Ausbeute bezogen auf die Anfangslactosekonzentration. <sup>e</sup> bezogen auf neu entstandene Galactose. <sup>f</sup> bezogen auf Gesamt-GOS-Ausbeute. Teile der Tabelle sind Bestandteil von Tab. 6 und Tab. 7 in [CF1].

Hinsichtlich der konkreten GOS-Strukturen (im Sinne der glykosidischen Bindungen) lassen sich mit den im Rahmen der Arbeit vorhandenen analytischen Methoden keine Aussagen treffen. Dennoch sind anhand des Retentionsverhaltens auf der Hi-Plex Na-Säule gewisse Unterschiede in Abhängigkeit von der Enzymquelle erkennbar (Abbildung 4-25).



**Abbildung 4-25:** HPLC-Chromatogramm (Säule: Hi-Plex Na) der GOS-Fraktion (DP2–5) in Abhängigkeit von der verwendeten  $\beta$ -Galactosidase, DP = Polymerisationsgrad.

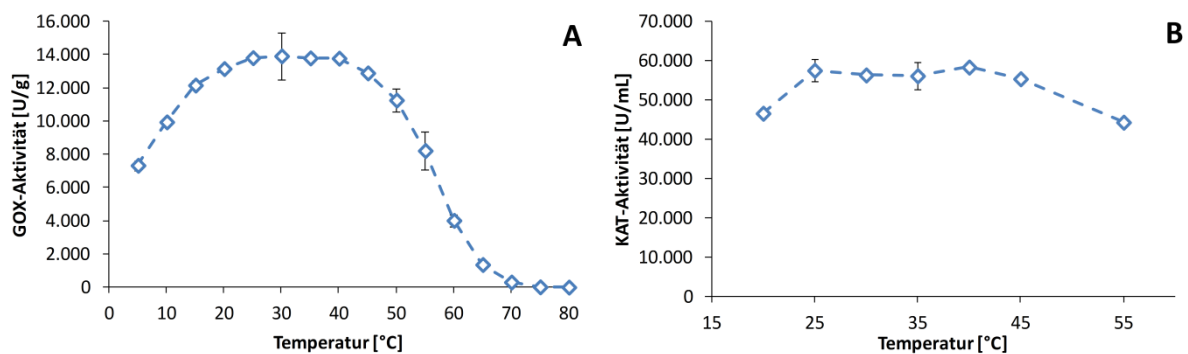
Beispielsweise synthetisiert *L. bulgaricus* GOS-Disaccharid(e) mit einer Retentionszeit von ca. 25,5 min und GOS-Trisaccharid(e) bei ca. 21 min, welche von keinem der anderen untersuchten  $\beta$ -Galactosidasen gebildet werden. Es ist bekannt, dass mit *L. bulgaricus*-Lactasen vorrangig  $\beta(1 \rightarrow 6)$ - und  $\beta(1 \rightarrow 3)$ -Verknüpfungen erzeugt werden [72, 326], während die Enzyme aus *A. oryzae* und *K. lactis* eine Präferenz für  $\beta(1 \rightarrow 6)$ -glykosidische Bindungen zeigen [126]. Somit kann vermutet werden, dass es sich bei den nach 21 min und 25,5 min eluierenden Zuckern um  $\beta(1 \rightarrow 3)$ -verknüpfte GOS handelt. Über die von *C. laurentii* gebildeten Strukturen ist wenig bekannt, allerdings macht

4'-Galactosyllactose mit ca. 55 % den weitaus größten Anteil aller gebildeten GOS (DP2–4) aus [65], sodass man davon ausgehen kann, dass diese glykosidische Bindung bevorzugt gebildet wird. Dies würde auch die unterschiedliche Retention der Tri- und Tetrasaccharide im Vergleich zu den jeweiligen Retentionszeiten der anderen drei Enzyme erklären.

### 4.3.6 Kopplung mit Glucose-Oxidase und Katalase

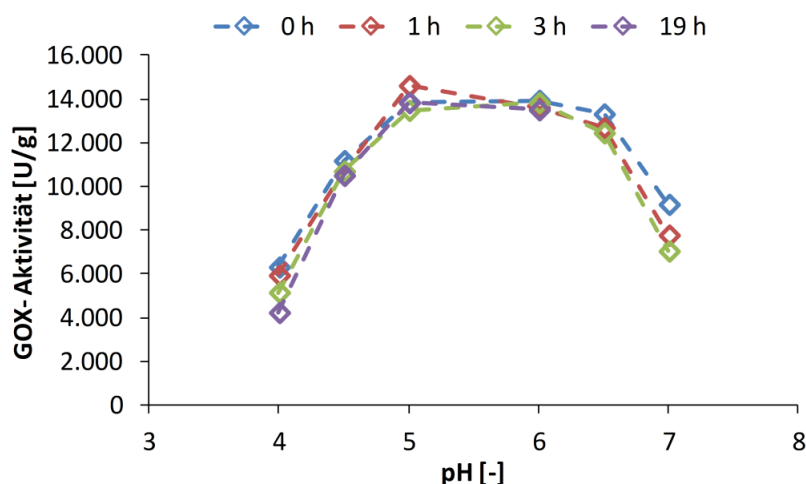
#### 4.3.6.1 Charakterisierung von Glucose-Oxidase und Katalase

Um die Prozessparameter für den Einsatz des Glucose-Oxidase/Katalase-Enzymsystems bei der GOS-Synthese festzulegen, wurden beide Enzyme auf Temperatur- und pH-Aktivität bzw. -Stabilität untersucht. Sowohl Glucose-Oxidase, als auch Katalase weisen ein breites Temperaturoptimum im Bereich von ca. 25–40°C auf (Abbildung 4-26). Demzufolge ist 40°C die maximal zulässige Temperatur für die GOS-Synthese.



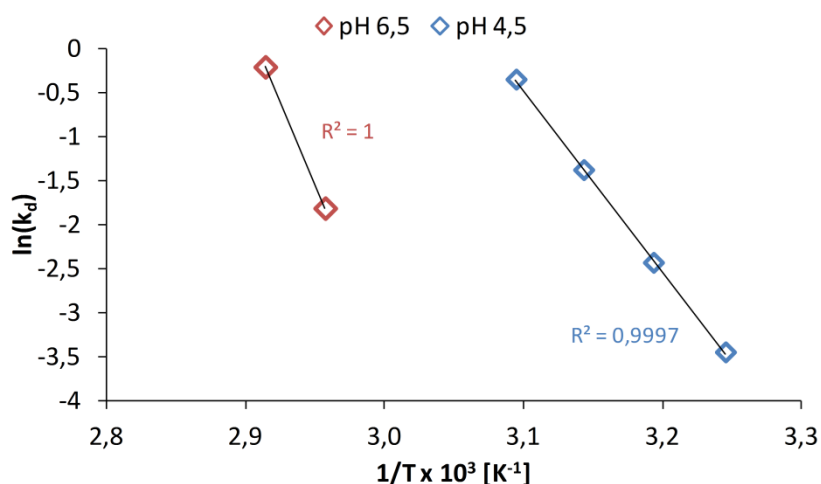
**Abbildung 4-26:** Abhängigkeit der Glucose-Oxidase (A)- und Katalase (B)-Aktivität in Units pro Gramm Pulver bzw. mL Lösung von der Temperatur. Assaybedingungen: Glucose-Oxidase: 50 mmol/L Na-Acetat pH 6,5 (n = 2); Katalase: 50 mmol/L K-Phosphat pH 7,0 (20–40°C: n = 2, 45°C und 55°C: n = 1). Abbildung publiziert als Fig. S3 (supplemental data) in [CF2].

Glucose-Oxidase zeigt ein pH-Optimum zwischen 5,0–6,5 und eine gute Stabilität über den gesamten untersuchten pH-Bereich bei Raumtemperatur (Abbildung 4-27). Bei pH 4,5 beträgt die relative Aktivität ca. 80 %, bei pH 6,5 ca. 95 % gegenüber dem Optimum bei pH 6,0. Die Restaktivität nach 3 h liegt bei beiden pH-Werten über 90 %, sodass von einer ausreichenden Stabilität für die Dauer der GOS-Synthese ausgegangen werden kann.



**Abbildung 4-27:** Glucose-Oxidase-Aktivität und -Stabilität bei Raumtemperatur in Units pro Gramm Pulver in Abhängigkeit vom pH-Wert. Assaybedingungen: 50 mmol/L Na-Acetat, 35°C (n = 2). Messung nach 19 h nur bei pH 4,0–6,0. Modifizierte Version dieser Abbildung publiziert als Fig. S1 (supplemental data) in [CF2].

Die Katalase-Aktivität wird vom Hersteller bei pH 7,0 in Kalium-Phosphat-Puffer bestimmt. Demgegenüber unterscheidet sich die Aktivität im PEM-Puffer bei pH 6,5 nur geringfügig (siehe Tabelle A.7-9). Auch bei pH 4,5 behält das Enzym knapp 60 % seiner Aktivität, allerdings geht die Absenkung des pH-Wertes mit einer deutlichen Stabilitätsminderung einher (Abbildung 4-28). Bei 40°C beträgt die Halbwertszeit bei pH 4,5 weniger als 8 min (siehe Tabelle A.7-12), wodurch es nötig wird, die Reaktionstemperatur der GOS-Synthese auf 25°C zu senken. Bei dieser Temperatur ist eine Halbwertszeit (extrapoliert) von ca. 3,5 h gewährleistet. Bei pH 6,5 wurde eine Halbwertszeit von ca. 4 min bei 65°C bestimmt (siehe Tabelle A.7-12), sodass kein merklicher Aktivitätsverlust während einer Synthese bei 25°C zu erwarten ist.

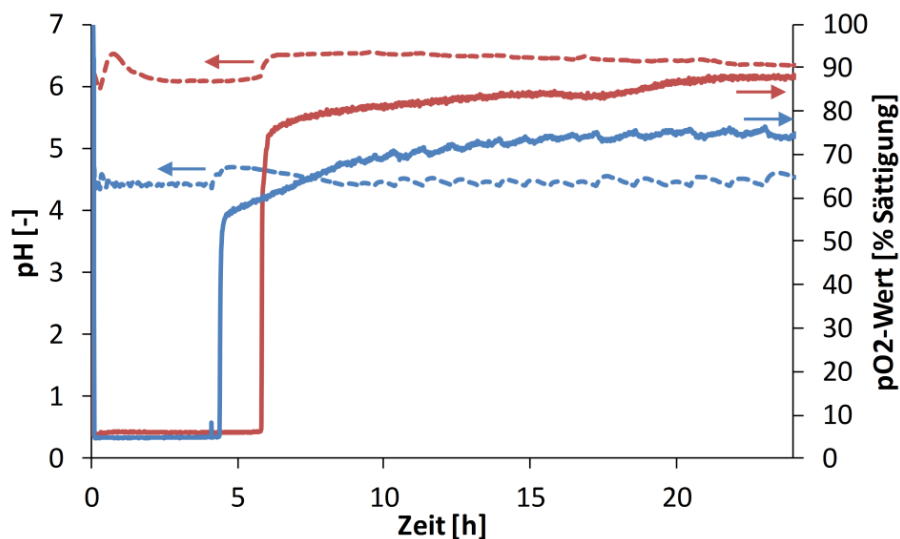


**Abbildung 4-28:** Arrhenius-Diagramm der Inaktivierung von Katalase aus *M. lysodeikticus* (Sigma Aldrich) bei pH 6,5 (PEM-Puffer) und pH 4,5 (Na-Acetat-Puffer). Rohdaten siehe Abbildung A.7-22.

#### 4.3.6.2 Einfluss simultaner Glucose-Entfernung auf die GOS-Ausbeute

Um den Einfluss der parallelen Glucose-Entfernung auf die GOS-Ausbeute zu untersuchen, wurde das Enzymsystem Glucose-Oxidase/Katalase mit  $\beta$ -Galactosidasen aus *A. oryzae* und *K. lactis* kombiniert. Der pH-Wert der Reaktionslösung wurde durch die Zudosierung von 40 % (w/w)  $\text{CaCO}_3$  in einem Bereich von 4,3–4,8 (*A. oryzae*) bzw. 5,9–6,5 (*K. lactis*) gehalten (Abbildung 4-29). Somit kann davon ausgegangen werden, dass keine Schädigung der  $\beta$ -Galactosidasen aufgrund von Änderungen im pH-Milieu auftrat.

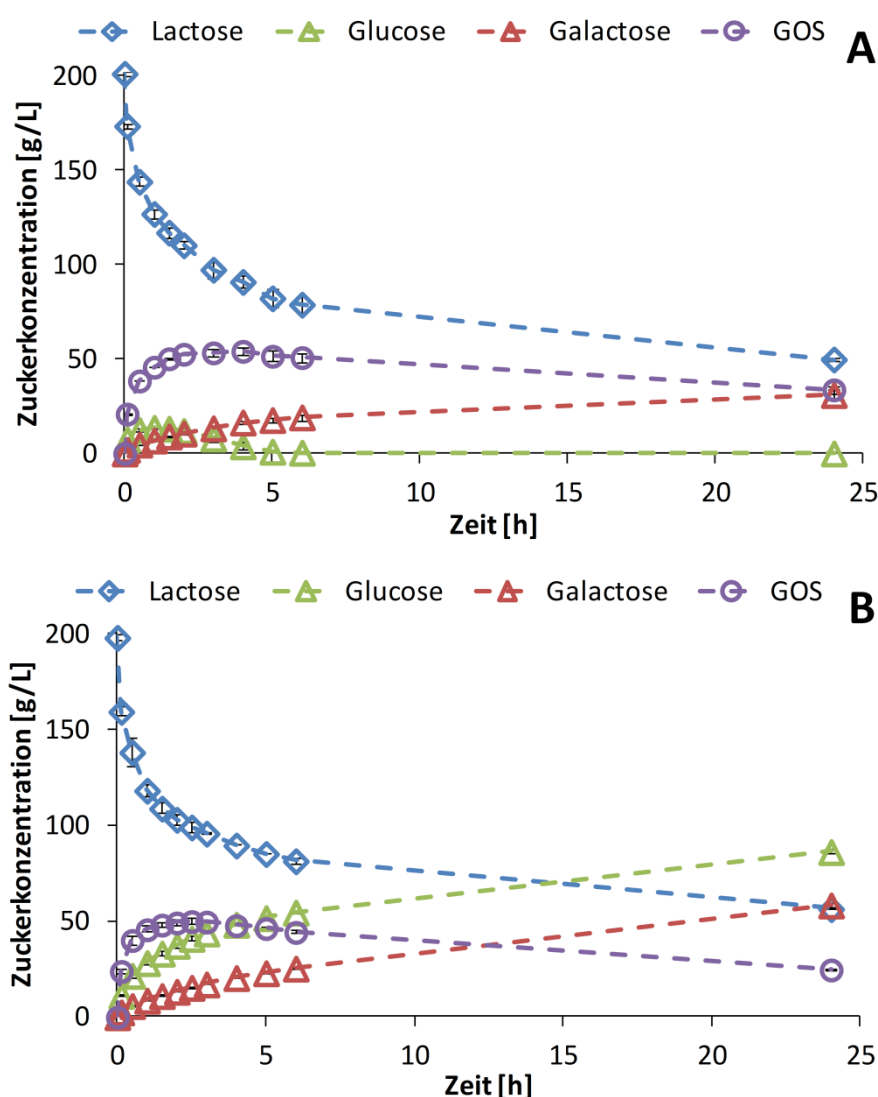
Direkt nach Zugabe der Enzyme fiel die Sauerstoffsättigung auf ca. 5 % und blieb bis zu einem sprunghaften Anstieg nach etwa 5 h weitestgehend konstant (Abbildung 4-29). Sowohl der Verbrauch des initial gelösten Sauerstoffs, als auch der Verbrauch des kontinuierlich über den Ring-Sparger bzw. Rührer zugeführten Sauerstoffs, weisen auf ein funktionierendes Enzymsystem Glucose-Oxidase/Katalase hin. Ersteres benötigt Sauerstoff zur Umwandlung der entstehenden Glucose in  $\delta$ -Gluconolacton, letzteres setzt das (andernfalls inhibierende [327]) Nebenprodukt  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu Wasser und Sauerstoff um [192]. Der Zeitpunkt des sprunghaften Anstiegs des Gelöstsauerstoffs korreliert gut mit der jeweiligen Zeit, zu der kaum noch freie Glucose im Reaktionsmix vorhanden ist (Abbildung 4-30A und Abbildung 4-31A). Im weiteren Reaktionsverlauf ist die Glucose-Konzentration sehr gering, da auch der Lactoseumsatz vermindert ist. Demnach wird nur wenig Sauerstoff von Glucose-Oxidase verwertet, sodass die Sauerstoffsättigung im System allmählich zunimmt. In der Kontrollreaktion ohne Glucose-Oxidase/Katalase und  $\text{CaCO}_3$ -Zugabe blieben sowohl pH-, als auch  $\text{pO}_2$ -Wert konstant (nicht gezeigt).



**Abbildung 4-29:** Zeitlicher Verlauf von pH- (linke Achse, gestrichelte Linien) und  $\text{pO}_2$ -Wert (rechte Achse, durchgezogene Linien) während der GOS-Synthese mit  $\beta$ -Galactosidasen aus *A. oryzae* (blau) und *K. lactis* (rot) in Kombination mit Glucose-Oxidase/Katalase. Der pH-Wert wurde mittels 40 %-iger (w/w)  $\text{CaCO}_3$ -Lösung geregelt. Abbildung publiziert als Fig. 1 in [CF2].

Bei der Kombination von  $\beta$ -Galactosidase aus *A. oryzae* mit dem Enzymsystem Glucose-Oxidase/Katalase, konnte zu Beginn der Reaktion kein vollständiger Glucoseabbau realisiert werden (Maximalwert: 13,6 g/L nach 1 h, Abbildung 4-30A). Dennoch wird ein erheblicher Unterschied zur Kontrollreaktion deutlich (Glucose-Konzentration nach 1 h: 28,3 g/L, Abbildung 4-30B). Dies bestätigt

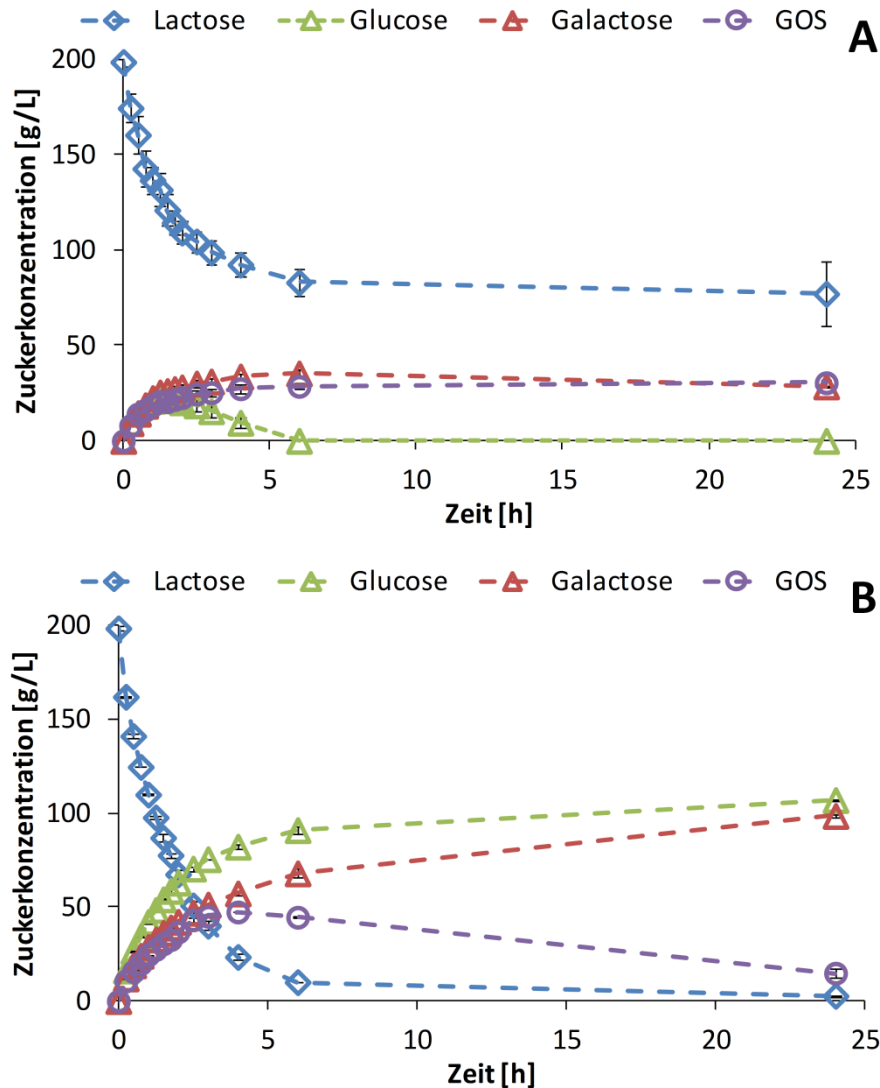
ein aktives Glucose-Oxidase/Katalase-System, was bereits durch den Verlauf der Sauerstoffsättigung prognostiziert wurde (Abbildung 4-29). Der Lactoseabbau ist in beiden Systemen vergleichbar, was darauf hinweist, dass die  $\beta$ -Galactosidase weder durch die zusätzlichen Enzyme, noch durch die Zugabe von  $\text{CaCO}_3$  gehemmt wird. Der Verlauf der GOS-Synthese verhält sich ebenfalls ähnlich, wobei eine geringe, jedoch nicht signifikante Ausbeutesteigerung mit der parallelen Glucose-Oxidation erhalten werden konnte (54,1 g/L im Vergleich zu 50,0 g/L, Tabelle 4-13). Zudem wird der Maximalwert etwas später erreicht (4 h im Vergleich zu 2,5 h). Bei beiden Reaktionen wird auch der GOS-Abbau und folglich ein deutlicher Anstieg der Galactose-Konzentration sichtbar. Dies zeigt, dass die  $\beta$ -Galactosidase über den gesamten beobachteten Zeitraum stabil und damit aktiv war.



**Abbildung 4-30:** GOS-Synthese mit  $\beta$ -Galactosidase aus *A. oryzae* (Maxilact A4) mit (A) und ohne (B) parallele Glucose-Entfernung mittels Glucose-Oxidase/Katalase,  $n = 2$ . Abbildung publiziert als Fig. 2 in [CF2].

Wurde das Glucose-Oxidase/Katalase-System mit einer  $\beta$ -Galactosidase aus *K. lactis* kombiniert, zeigte sich jedoch ein anderes Reaktionsverhalten (Abbildung 4-31). Obwohl der Lactoseumsatz mit *A. oryzae* und *K. lactis* während der ersten 4 h nahezu identisch war, unterscheiden sich die Glucose-Konzentrationsprofile erheblich (Abbildung 4-30A und Abbildung 4-31A). Die maximale Glucose-

Konzentration ist im *K. lactis*/GOX-System mit 22,6 g/L (nach 1,3 h) um den Faktor 1,6 höher. Demnach arbeitet Glucose-Oxidase in diesem System weniger effizient. Da sich die Enzymaktivitäten und –stabilitäten bei pH 4,5 und 6,5 kaum unterscheiden (Abbildung 4-27), kann nur vermutet werden, dass freie Calcium-Ionen durch die Zugabe von  $\text{CaCO}_3$  die Reaktionsgeschwindigkeit von Glucose-Oxidase beeinflussen, denn die Menge an  $\text{CaCO}_3$ , welche zur pH-Wert-Kontrolle notwendig war, unterschied sich deutlich in beiden Systemen (4 mL für *A. oryzae*, 70 mL für *K. lactis* nach jeweils 0,5 h).



**Abbildung 4-31:** GOS-Synthese mit  $\beta$ -Galactosidase aus *K. lactis* (optilactase LX2) mit (A) und ohne (B) parallele Glucose-Entfernung mittels Glucose-Oxidase/Katalase,  $n = 2$ . Modifizierte Version dieser Abbildung publiziert als Fig. 3 in [CF2].

Vergleicht man den Lactoseumsatz des *K. lactis*/GOX-Systems mit der Kontrollreaktion, so ist dieser im erstgenannten allerdings deutlich vermindert (61,3 % verglichen mit 98,6 % nach 24 h). Dies stimmt prinzipiell mit den Ergebnissen anderer Autoren, die ebenfalls *K. lactis* und Glucose-Oxidase kombinierten, überein [194, 195], dennoch ist der Unterschied in den vorliegenden Ergebnissen deutlich ausgeprägter. Grund hierfür könnte die Wahl der Base zur Einstellung des pH-Wertes sein. Bei Verwendung von NaOH [194, 195] bleibt Gluconsäure in Lösung, während mit  $\text{CaCO}_3$  Calciumgluconat ausfällt, welches keine inhibierende Wirkung mehr hat [104]. Allerdings werden

somit auch freie Calcium-Ionen in das Reaktionsmedium gebracht (siehe Abbildung A.7-30). Im Allgemeinen gilt Calcium als Inhibitor, gleichwohl die oNPG-Aktivität dieses Enzyms bis zu einer Konzentration von 10 mmol/L nicht beeinträchtigt wird (siehe Tabelle A.7-10). Diese Konzentration wird jedoch erst nach ca. 1,5 h erreicht (siehe Abbildung A.7-30), der Lactoseumsatz ist jedoch bereits von Beginn an vermindert. Dies legt nahe, dass neben dem möglichen Einfluss von Calcium noch andere Ursachen existieren müssen. Auch die Konzentration an freier Glucose unterscheidet sich erheblichen in den beiden Systemen (16,2 g/L verglichen mit 9,6 g/L nach jeweils 15 min), sodass der verminderte Lactoseabbau ebenso gut auf die geringere Glucose-Konzentration selbst zurückgeführt werden kann. Obwohl Glucose als unkompetitiver Inhibitor gilt [100], war der Lactoseumsatz bei höheren Anfangslactosekonzentrationen (250 g/L im Vergleich zu 10–60 g/L in [100]) nicht vermindert [126], trotz vergleichbarer molarer Glucose/Lactose-Verhältnisse (0,2–4,7 in [100] und 0,8 in [126]). Dies legt einen gewissen Einfluss der ILC auf das Ausmaß der Inhibierung durch Glucose nahe. Da im vorliegenden Experiment mit einer verhältnismäßig hohen ILC (200 g/L) gearbeitet wurde, mag der inhibierende Einfluss der entstehenden Glucose marginal sein, wodurch auch keine Verbesserung bei Entzug derselben eintritt. Im Gegenteil, die freigesetzte Glucose mag als potenzielles Akzeptormolekül [126] für die  $\beta$ -Galactosidase aus *K. lactis* zwingend erforderlich sein, um einen effizienten Lactoseumsatz zu realisieren. Dies konnte bereits für das Lactose-ähnliche Substrat oNPG gezeigt werden, bei dem ein Anstieg in der initialen Glucose-Konzentration, eine höhere Enzymaktivität zur Folge hatte [103]. Trotz des verminderten Umsatzes sinkt auch im *K. lactis*/GOX-System die Lactose-Konzentration stetig während der ersten 6 h, sodass davon ausgegangen werden kann, dass eine ausreichende Enzymaktivität vorhanden ist, um die Transgalactosylierungsreaktion auszuführen.

Im Hinblick auf die GOS-Synthese ist die Ausbeute im System mit paralleler Glucose-Oxidation sichtbar vermindert (47,4 g/L im Vergleich zu 30,5 g/L, Tabelle 4-13). Grund hierfür ist die deutlich reduzierte Synthese von GOS-Disacchariden (7,2 g/L im Vergleich zu 27,7 g/L). Disaccharide machen jedoch einen erheblichen Anteil der Gesamt-GOS von *K. lactis*- $\beta$ -Galactosidasen aus [130], folglich macht sich eine verminderte Synthese von DP2-GOS deutlich in der Gesamt-GOS-Ausbeute bemerkbar. Grund für die verringerte Disaccharid-Synthese ist der Entzug von Glucose, welche bei der intermolekularen Transgalactosylierung als Akzeptormolekül dient, wodurch z. B. Allolactose entsteht [126]. Im Gegensatz dazu ermittelten Rico-Rodríguez et al. [194] sogar eine leicht verbesserte GOS-Disaccharid-Synthese mit *K. lactis* im System mit Glucose-Oxidase (20,1 % vs. 18,7 %). Allerdings wies die Reaktionslösung bei den genannten Autoren trotz Einsatz von GOX/KAT noch einen beträchtlichen Anteil an Glucose (ca. 30 % der Gesamtzucker zum Zeitpunkt der maximalen GOS-Ausbeute) auf. Dies deutet, ebenso wie die geringen Gluconsäure-Konzentrationen, auf ein suboptimal funktionierendes GOX/KAT-System hin, möglicherweise hervorgerufen durch einen geringeren Lufteintrag (0,01 L/min), eine höhere Reaktionstemperatur (40°C) und ein kleineres  $\beta$ -Galactosidase/GOX-Verhältnis (ca. 1:1). Die Verdopplung von letzterem erwies sich in der Studie von Rico-Rodríguez et al. [194] zwar als vorteilhaft hinsichtlich der Gluconsäure-Ausbeute, durch die sequentielle Zugabe von GOX blieb die Glucose-Konzentration zu Beginn der Reaktion jedoch in einem ähnlichen Bereich wie im Referenzsystem. Damit ist Glucose weiterhin als Galactosyl-Akzeptor verfügbar und die Disaccharid-Bildung folglich ähnlich derer im System ohne GOX-Zugabe.

**Tabelle 4-13:** Zusammensetzung der Reaktionslösung zum Zeitpunkt der maximalen GOS-Ausbeute unter Verwendung der  $\beta$ -Galactosidasen aus *K. lactis* und *A. oryzae*, jeweils mit und ohne Glucose-Oxidase/Katalase (GOX/KAT)\*, n. d. = nicht detektiert.

Enzymsystem	<i>K. lactis</i>	<i>K. lactis</i> /GOX/KAT	<i>A. oryzae</i>	<i>A. oryzae</i> /GOX/KAT
Zeit [h] <sup>a</sup>	4	24	2,5	4
Glucose [g/L]	82,1 <sup>a</sup> ± 1,0	n. d. <sup>c</sup>	41,0 <sup>b</sup> ± 1,0	3,8 <sup>c</sup> ± 2,0
Galactose [g/L]	57,2 <sup>a</sup> ± 1,2	28,5 <sup>b</sup> ± 0,6	15,4 <sup>c</sup> ± 0,3	16,4 <sup>c</sup> ± 0,8
Lactose [g/L]	23,5 <sup>b</sup> ± 1,4	77,1 <sup>a</sup> ± 17,2	99,3 <sup>a</sup> ± 2,6	90,9 <sup>a</sup> ± 3,1
Gesamt-GOS [g/L]	47,4 <sup>a</sup> ± 0,1	30,5 <sup>b</sup> ± 1,7	50,0 <sup>a</sup> ± 1,3	54,1 <sup>a</sup> ± 1,9
GOS ≥ DP3 [g/L]	19,7 <sup>b</sup> ± 0,0	23,3 <sup>b</sup> ± 0,4	49,2 <sup>a</sup> ± 1,3	53,4 <sup>a</sup> ± 1,8
DP2-GOS [g/L]	27,7 <sup>a</sup> ± 0,0	7,2 <sup>b</sup> ± 1,3	0,8 <sup>c</sup> ± 0,0	0,7 <sup>c</sup> ± 0,0
DP3-GOS [g/L]	19,1 <sup>b</sup> ± 0,0	22,4 <sup>b</sup> ± 0,2	35,0 <sup>a</sup> ± 0,8	36,4 <sup>a</sup> ± 1,3
DP4-GOS [g/L]	0,6 <sup>c</sup> ± 0,0	0,9 <sup>c</sup> ± 0,2	11,3 <sup>b</sup> ± 0,4	13,6 <sup>a</sup> ± 0,3
DP5-GOS [g/L]	n. d. <sup>c</sup>	n. d. <sup>c</sup>	2,5 <sup>b</sup> ± 0,1	3,4 <sup>a</sup> ± 0,2
DP6-GOS [g/L]	n. d. <sup>b</sup>	n. d. <sup>b</sup>	0,3 <sup>a</sup> ± 0,1	n. d. <sup>b</sup>
Y <sub>GOS</sub> [%] <sup>b</sup>	23,9 <sup>a</sup> ± 0,1	15,4 <sup>b</sup> ± 1,0	25,0 <sup>a</sup> ± 0,6	26,9 <sup>a</sup> ± 0,8

<sup>a</sup> Zeit, bei der die maximale GOS-Ausbeute erreicht wird. <sup>b</sup> Gesamt-GOS-Konzentration in Bezug auf die Anfangslactosekonzentration in %. \* Werte in einer Zeile mit unterschiedlichem Exponent unterscheiden sich signifikant (Tukey-HSD-Test,  $\alpha = 0,05$ ). Modifizierte Version dieser Tabelle publiziert als Tab. 1 in [CF2].

Bezüglich der Synthese von GOS-Disacchariden sind die hier gezeigten Ergebnisse im Einklang mit denen von Cheng et al. [193], welche deutlich weniger DP2-GOS mit *B. circulans* erhielten, wenn Glucose dem Reaktionsmedium entzogen wurde (1,5 g vs. 6,7 g). Auch in diesem Fall resultierte dies in einer Minderung der Gesamt-GOS-Ausbeute von 38 % auf 33 %. Ähnliches konnte auch Benjamins [328] anhand der Bildung des Disaccharids Allolactose zeigen, welches mit ca. 20 % einen großen Anteil der Gesamt-GOS von *B. circulans* ausmacht. Die Allolactose-Synthese wurde bei Zugabe von Glucose verdoppelt bzw. bei paralleler Entfernung durch eine Hexokinase aus *Saccharomyces cerevisiae* um ca. 1/3 vermindert. Grund ist die erhöhte bzw. verminderte intermolekulare Transgalactosylierung auf den Akzeptor Glucose.

Werden lediglich GOS mit einem Polymerisationsgrad von drei oder mehr betrachtet, so ist die Ausbeute mit dem *K. lactis*/GOX/KAT-System sogar etwas höher (23,3 g/L vs. 19,7 g/L) und damit ähnlich zu dem Ergebnis mit dem *A. oryzae*-Enzym (53,4 g/L vs. 49,2 g/L). Allerdings sind diese Unterschiede nicht signifikant (Tabelle 4-13). Dennoch kann man anhand der Ergebnisse schlussfolgern, dass im GOX/KAT-System Di- und höhere Oligosaccharide bevorzugt als Akzeptormolekül genutzt werden, da kaum Monosaccharide im Reaktionsmix vorhanden sind und somit die Wahrscheinlichkeit sinkt, dass diese als Akzeptor fungieren. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnisse von Mueller et al. [195], welche aufgrund der analytischen Methode ebenfalls nur GOS mit einem DP ≥ 3 betrachteten, aber keinen Unterschied in der GOS-Ausbeute mit *K. lactis* fanden. Der Grund hierfür ist wiederum in der Glucose-Konzentration zu finden, welche in beiden Systemen mit und ohne GOX/KAT ähnlich hohe Werte erreichte, sodass das umgebende Medium – in Form von verfügbaren Akzeptormolekülen –



sich nicht wesentlich von dem im Kontrollexperiment unterschied, wodurch keine Änderung im Syntheseverhalten beobachtet werden konnte.

In Übereinstimmung mit den hier gezeigten Ergebnissen ermittelten Cheng et al. [193] für *B. circulans* eine gesteigerte Bildung von Tri- und Tetrasacchariden (31,8 g vs. 30,9 g im Referenzsystem). Gleiches gilt auch für eine  $\beta$ -Galactosidase aus *S. magnum* (234 g/L vs. 136 g/L im Referenzsystem, [104]). Demnach kann man generell schlussfolgern, dass eine Erhöhung des Anteils von Tri- und längerkettigen Oligosacchariden erreicht werden kann, sofern das Enzymsystem Glucose-Oxidase/Katalase effizient funktioniert. Das Ausmaß dieser Ausbeutesteigerung hängt jedoch maßgeblich von der verwendeten Enzymquelle ab und kann für *B. circulans* bzw. *A. oryzae* lediglich um den Faktor 1,03 bzw. 1,08, für *K. lactis* um den Faktor 1,18 und für *S. magnum* sogar um den Faktor 1,72 gesteigert werden.

Trotz der Tatsache, dass die Ausbeutesteigerung ( $\geq$  DP3) für die beiden untersuchten Enzyme sehr gering ist, so wird durch die Entfernung der Glucose eine gewisse Aufreinigung des Reaktionsmixes erzielt. Für *K. lactis* kann so der Gesamtzuckergehalt um ca. 35 % (von 210,2 g/L auf 136,1 g/L), für *A. oryzae* um ca. 20 % (von 205,7 g/L auf 165,2 g/L) gesenkt werden. Damit sinkt der Kaloriengehalt, was besonders für Diabetikernahrung von Interesse ist. Der GOS-Anteil (inkl. DP2) im Verhältnis zum Gesamtzucker kann bei *K. lactis* aufgrund der verminderten Disaccharidsynthese nicht gesteigert werden. Mit dem *A. oryzae*-Enzym kann jedoch eine Aufreinigung um den Faktor 1,35 erzielt werden (GOS-Anteil steigt von 24,3 % auf 32,8 %). Es verbleiben jedoch auch 2,3 % Glucose (3,8 g/L) in der Lösung. Für eine vollständige Glucose-Entfernung müsste daher mehr Glucose-Oxidase bzw. weniger  $\beta$ -Galactosidase eingesetzt werden, um den Glucoseabbau zu beschleunigen bzw. die Glucose-Freisetzungsrates zu reduzieren. Eine Verlängerung der Reaktionszeit unter den untersuchten Bedingungen ist nur bedingt zu empfehlen, da bereits 2 h nach Erreichen der maximalen Ausbeute, der einsetzende GOS-Abbau einen Verlust von ca. 3,3 g/L GOS bei 0,4 g/L Restglucose mit sich bringt.

#### 4.3.6.3 Schlussfolgerungen

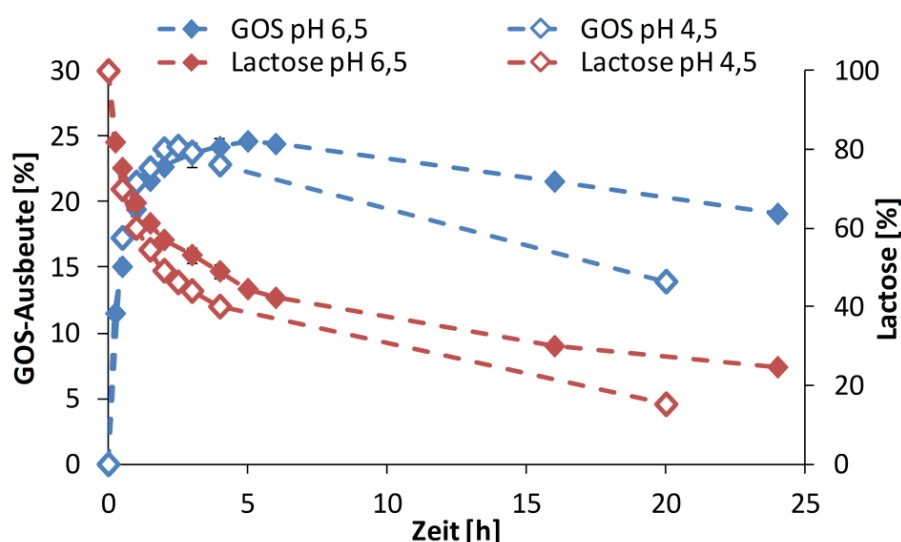
Zusammenfassend kann aus den eigenen Untersuchungen mit *A. oryzae* und *K. lactis* sowie den Ergebnissen mit *B. circulans* und *S. magnum* geschlussfolgert werden, dass eine parallele Entfernung von Glucose während der GOS-Synthese vor allem für solche  $\beta$ -Galactosidasen sinnvoll ist, welche bevorzugt Disaccharide als Akzeptormolekül verwenden.  $\beta$ -Galactosidasen, die bevorzugt glucosehaltige Disaccharide bilden sind im Hinblick auf die Erhöhung der Gesamt-GOS-Ausbeute nicht geeignet, wenngleich auch hier eine Steigerung des Anteils längerkettiger GOS ( $\geq$  DP3) möglich scheint.

### 4.3.7 Kombination mehrerer $\beta$ -Galactosidasen

#### 4.3.7.1 Kopplung von *A. oryzae* und *K. lactis*

Sollte sich die GOS-Synthese mit zwei  $\beta$ -Galactosidasen als vorteilhaft erweisen, so wäre es für eine industrielle Anwendung erstrebenswert, wenn auf eine Umpufferung (bei sequentieller Kombination) verzichtet werden könnte. Analog muss bei parallelem Einsatz beider Enzyme ein Puffer gefunden werden, der für beide Lactasen eine ausreichende Aktivität und Stabilität gewährleistet. Die  $\beta$ -Galactosidasen aus *K. lactis* und *A. oryzae* unterscheiden sich deutlich in ihrem pH-Optimum. Auch ist die

laut FCC-Methode [64] empfohlene Zusammensetzung des Puffers verschieden. Da das Enzym aus *K. lactis* empfindlicher auf Milieuänderungen reagiert und gleichermaßen das Enzym aus *A. oryzae* kaum von Medienbestandteilen beeinflusst wird, wurde untersucht, ob der für *K. lactis* optimierte PEM-Puffer auch für die *A. oryzae*-Lactase verwendet werden kann. Ebenso wurde geprüft, ob das bisher vorrangig im sauren Milieu eingesetzte Enzym auch bei höheren pH-Werten zur GOS-Synthese ausreichend befähigt ist. Wie in Abbildung 4-32 zu sehen, ist die GOS-Ausbeute bei pH 4,5 und 6,5 mit ca. 24 % vergleichbar. Lediglich die GOS-Abbau-Geschwindigkeit ist bei dem niedrigeren pH-Wert etwas erhöht. Dies kann auf eine möglicherweise verminderte Stabilität des Enzyms bei pH 6,5 zurückgeführt werden, sodass die Reaktionsgeschwindigkeit im Allgemeinen unter diesen Bedingungen vermindert ist, wofür auch das spätere Ausbeutemaximum und der langsamere Lactoseumsatz (Abbildung 4-32) spricht. Zu ähnliche Ergebnisse kamen auch Albayrak & Yang [132] mit einem immobilisierten Enzym aus *A. oryzae* im pH-Bereich 4,5–6,0. Nichtsdestotrotz kann die GOS-Synthese im PEM-Puffer bei pH 6,5 unter den getesteten Bedingungen (Enzymmenge) erfolgreich durchgeführt werden. Somit kann auf eine Umpufferung bzw. die Zugabe weiterer Reagenzien (so beschrieben von Tomiuk [187]) verzichtet werden.

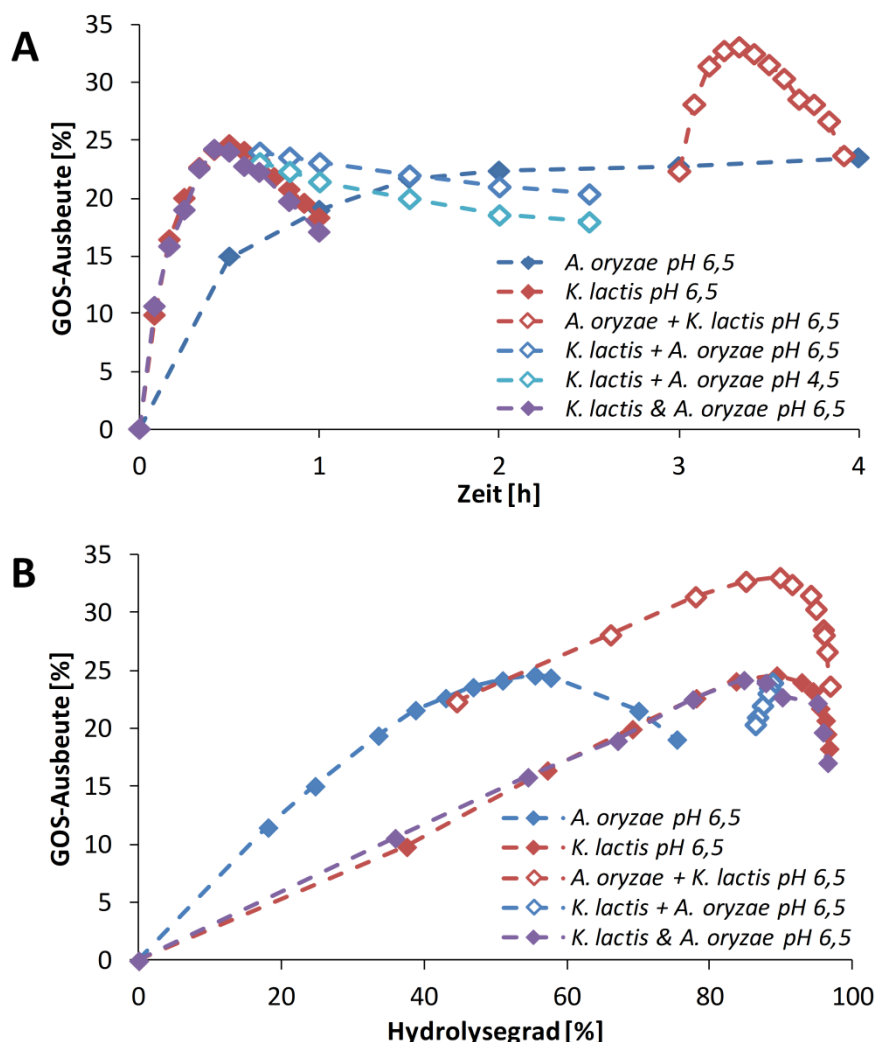


**Abbildung 4-32:** GOS-Ausbeute (linke Achse) und Lactoseumsatz (rechte Achse) mit *A. oryzae* (Maxilact A4) in Abhängigkeit von der Reaktionszeit bei pH 4,5 (offene Symbole) und pH 6,5 (geschlossene Symbole). Puffer: PEM pH 6,5, McIlvaine pH 4,5, ILC = 200 g/L, E/S = 50 U/g, T = 55°C, n = 2 für pH 6,5 0–4 h, n = 1 für pH 4,5 und pH 6,5 5–24 h.

Die Ergebnisse der GOS-Synthese aller eingesetzten Enzymkombination im Vergleich zur Synthese mit jeweils einem der Enzyme ist in Abbildung 4-33 dargestellt. Bei der sequentiellen Kopplung wurde das jeweils zuerst eingesetzte Enzym zum Zeitpunkt der maximalen GOS-Ausbeute inaktiviert, um einen Abbau der bereits gebildeten GOS zu verhindern. Bei der sequentiellen Kombination von *K. lactis* und *A. oryzae* stellte sich jedoch heraus, dass die mit *K. lactis* erzielte GOS-Ausbeute von 24,6 % durch den nachgeschalteten Einsatz von *A. oryzae* nicht gesteigert werden konnte. Im Gegenteil, die gebildeten GOS fungierten auch für die *A. oryzae*- $\beta$ -Galactosidase als Substrat, sodass die Ausbeute nach 2 h (Gesamtzeit 2,5 h) auf 20,4 % (pH 6,5) bzw. 18 % (pH 4,5) sank.

Anders verhielt es sich, wenn zunächst mit der *A. oryzae*- $\beta$ -Galactosidase und anschließend mit dem *K. lactis*-Enzym synthetisiert wurde. Die GOS-Ausbeute konnte so deutlich von 22,7 % (nach 3 h mit

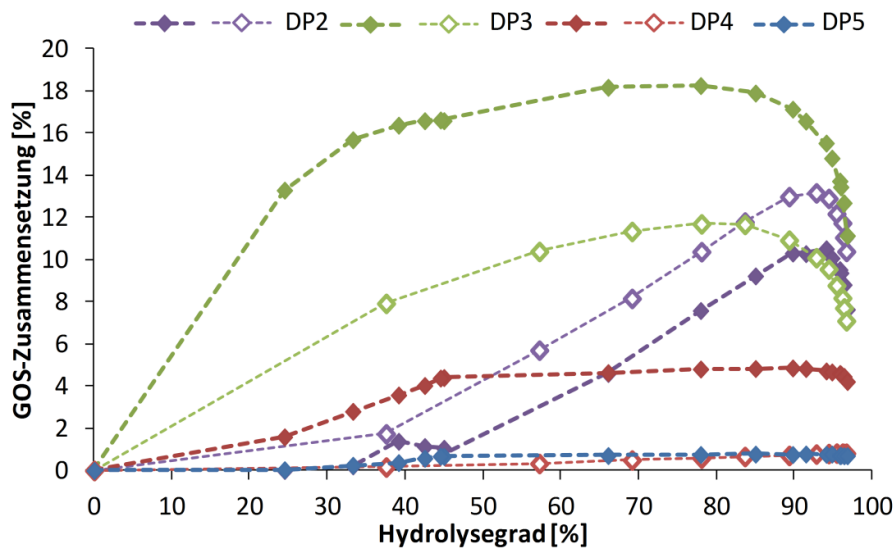
*A. oryzae*) auf 33,1 % (nach weiteren 20 min mit *K. lactis*) gesteigert werden. Verglichen mit der jeweils maximalen Ausbeute bei Verwendung nur eines Enzyms (24,6 %), ergibt sich somit eine Steigerung der Ausbeute um etwa 8,5 %. Anhand Abbildung 4-34 lässt sich erkennen, dass dies vor allem auf die Bildung von GOS-Disacchariden zurückzuführen ist.



**Abbildung 4-33:** GOS-Ausbeute in Abhängigkeit von der Zeit (A) und dem Hydrolysegrad (B) bei Verwendung von *A. oryzae* (Maxilact A4) und *K. lactis* (optilactase LX2), sowie sequentieller (+, mit Inaktivierung des 1. Enzyms) und paralleler (&) Kopplung beider Enzyme. Puffer: PEM pH 6,5 bzw. pH 4,5, ILC = 200 g/L, E/S = 50 U/g, T = 45°C für *K. lactis* und parallele Synthese, T = 55°C für *A. oryzae*, n = 1. Modifizierte Version von Abbildung 4-33B publiziert als Fig. 3 in [CF3].

Während das Enzym aus *A. oryzae* vorrangig Tri- und nur wenig Disaccharide bildet (Abbildung 4-34), so vermag das *K. lactis*-Enzym die bereits entstandenen Monosaccharide als Akzeptormolekül zu nutzen [126] und somit vor allem neue GOS-Disaccharide zu synthetisieren. Die Menge bleibt jedoch unterhalb derer, die bei alleiniger Synthese mit *K. lactis* erhalten wird (10,3 % vs. 13 %). Ebenso ist bei der sequentiellen Synthese auch ein leichter Anstieg der Trisaccharide zu verzeichnen, die Konzentration an Tetra- und Pentasaccharide ändert sich nicht. Demnach vermag *K. lactis* aufgrund einer hohen Präferenz für Monosaccharide zwar nicht die von *A. oryzae* aufgebauten GOS-Trisaccharidstrukturen als Akzeptor zu nutzen und somit länger-kettige GOS aufzubauen, aber sie dienen auch nicht als Substrat und bleiben somit der finalen GOS-Mischung erhalten. In Summe kann

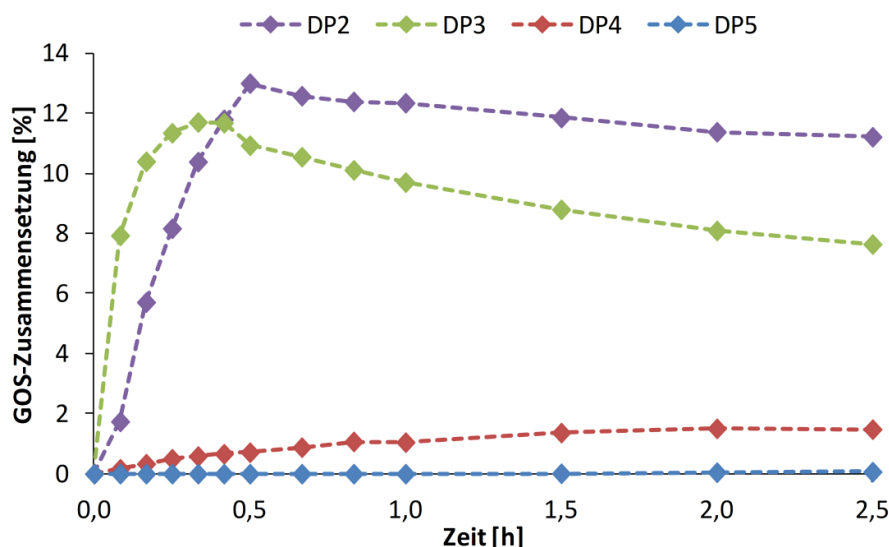
mit der sequentiellen Synthese also nicht nur die GOS-Ausbeute, sondern auch der Anteil an Tri- und höheren Oligosacchariden gegenüber der Synthese mit nur einem der untersuchten Enzyme, gesteigert werden.



**Abbildung 4-34:** GOS-Zusammensetzung (DP = Polymerisationsgrad) in % des Gesamtzuckers in Abhängigkeit vom Hydrolysegrad bei alleiniger Synthese mit *K. lactis* (offene Symbole) sowie sequentieller Kopplung von *A. oryzae* (3 h, ca. 45 % Hydrolyse) und *K. lactis* (geschlossene Symbole). Das Ausbeutemaximum wird mit beiden Systemen bei 90 % Hydrolyse erhalten. Puffer: PEM pH 6,5, ILC = 200 g/L, E/S = 50 U/g, T = 45°C für *K. lactis*, T = 55°C für *A. oryzae*. Modifizierte Version publiziert als Fig. 4B in [CF3].

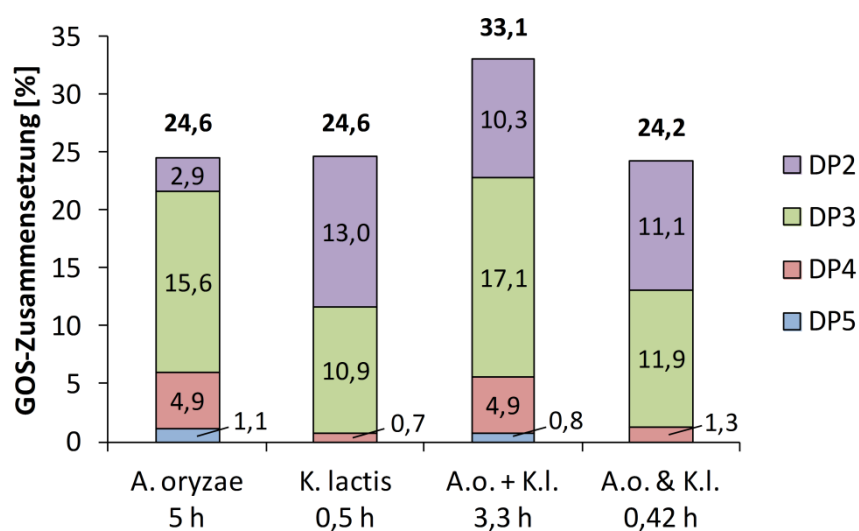
Bei der sequentiellen Enzymkombination wäre neben Änderungen im Transgalactosylierungsverhalten aufgrund der veränderten Anfangsbedingungen (Vorhandensein potenzieller Inhibitoren Glucose, Galactose, GOS) auch eine Beeinflussung des Lactoseabbaus denkbar. Mit *K. lactis* wird die maximale GOS-Ausbeute jedoch stets bei ca. 90 % Hydrolyse erreicht, unabhängig davon, ob mit dem Einzelenzym oder in Kombination mit *A. oryzae* gearbeitet wurde (Abbildung 4-33B). Neben dem GOS-Aufbau wird beim sequentiellen Einsatz *A. oryzae* – *K. lactis* vor allem auch die hydrolytische Aktivität des *K. lactis*-Enzyms deutlich (Anstieg des Hydrolysegrades von 45 % auf 90 %), was sich mit Literaturangaben deckt [187]. Beim parallelen Einsatz beider Enzyme zeigte sich kein Effekt auf die GOS-Ausbeute oder Lactosehydrolyse. Anhand des Kurvenverlaufs kann vermutet werden, dass das *K. lactis*-Enzym die Reaktion dominiert, vermutlich bedingt durch eine höhere Affinität zu Lactose und/oder einer stärkeren (kompetitiven) Inhibierung des Lactoseumsatzes durch *A. oryzae* aufgrund der (vor allem durch *K. lactis*) freigesetzten Galactose. Der sequentielle Einsatz *K. lactis* – *A. oryzae* führt, wie zuvor beschrieben, zu keiner Steigerung der Ausbeute. Der Hydrolysegrad sinkt hingegen leicht (von 88,7 % auf 86,3 %, Abbildung 4-33B), bedingt durch die Spaltung von – von *K. lactis* gebildeten – Galactosyllactosen [126], wodurch wieder freie Lactose entsteht. Die Glucose- bzw. Galactose-Konzentration und damit auch der Glc/Gal-Faktor (Wert: 1,4) ändern sich hingegen kaum (siehe Abbildung A.7-31). Demzufolge ist anzunehmen, dass die ebenfalls entstehende Galactose nicht freigesetzt, sondern vorrangig auf ein anderes Zuckermolekül übertragen wird. Dies wird ebenfalls ersichtlich aus Abbildung 4-35: Vor allem der Anteil an Trisacchariden nimmt deutlich ab, hingegen steigt der Anteil an Tetrasacchariden (von 0,7 % nach 30 min *K. lactis* auf 1,5 % nach weiteren 2 h *A. oryzae*). Demnach fungieren die *K. lactis*-Trisaccharide offenbar gleichermaßen als Sub-

strat- als auch als Akzeptormolekül. Auch kommt es in Folge zur Synthese von Pentasacchariden (0,07 % nach 2 h *A. oryzae*). Der Anteil an GOS-Disacchariden nimmt durch den Umbau zu länger-kettigen GOS insgesamt leicht ab.



**Abbildung 4-35:** GOS-Zusammensetzung (DP = Polymerisationsgrad) in % des Gesamtzuckers in Abhängigkeit von der Reaktionszeit bei sequentieller Kopplung von *K. lactis* (0,5 h) und *A. oryzae* (0,5–2,5 h). Puffer: PEM pH 6,5, ILC = 200 g/L, E/S = 50 U/g, T = 45°C für *K. lactis*, T = 55°C für *A. oryzae*. Modifizierte Version publiziert als Fig. 4A in [CF3].

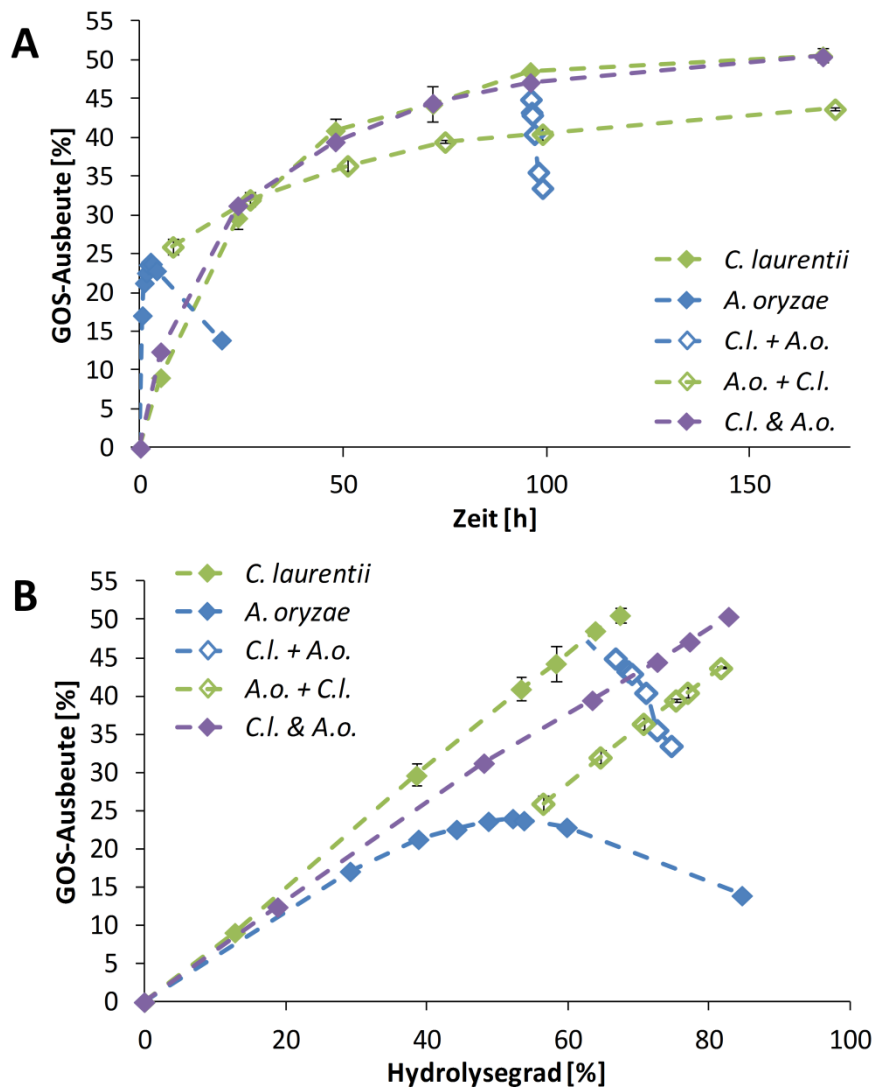
Die Abbildung 4-36 stellt die jeweilige GOS-Zusammensetzung zum Zeitpunkt der maximalen Ausbeute gegenüber. Hinsichtlich der Maximierung der Gesamtausbeute ist die sequentielle Kopplung von *A. oryzae* – *K. lactis* zu favorisieren. Interessieren jedoch nur GOS  $\geq$  DP3, so sind die zusätzlichen Kosten für den Einsatz eines zweiten Enzyms abzuwägen, da dieser Anteil im Vergleich zur alleinigen Synthese mit *A. oryzae* kaum erhöht ist (22,8 % vs. 21,6 %).



**Abbildung 4-36:** GOS-Zusammensetzung (DP = Polymerisationsgrad) in % des Gesamtzuckers in Abhängigkeit von verschiedenen Enzymkombinationen. Die Werte über den jeweiligen Balken entsprechen der Gesamtausbeute.

#### 4.3.7.2 Kopplung von *A. oryzae* und *C. laurentii*

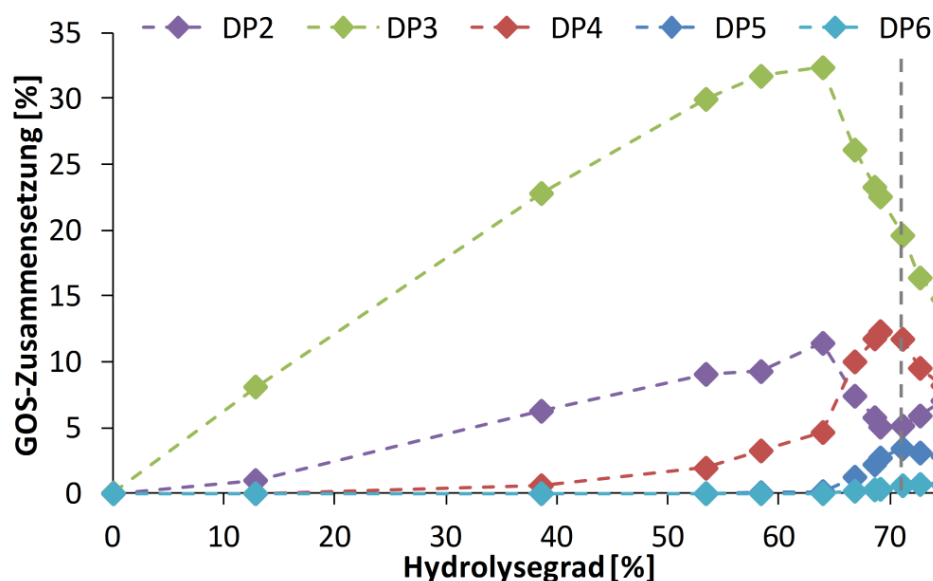
Die Enzyme aus *A. oryzae* und *C. laurentii* sind beide säureaktiv und –stabil, daher konnte für die Kopplung beider  $\beta$ -Galactosidasen dasselbe Puffersystem (McIlvaine-Puffer pH 4,5) verwendet werden.



**Abbildung 4-37:** GOS-Ausbeute in Abhängigkeit von der Zeit (A) und dem Hydrolysegrad (B) bei Verwendung von *A. oryzae* (Maxilact A4) und *C. laurentii* (ganze Zellen), sowie sequentieller (C.l.+A.o., A.o.+C.l.) und paralleler (C.l.&A.o.) Kopplung beider Enzyme. Puffer: 50 mmol/L McIlvaine pH 4,5, ILC = 200 g/L, E/S = 50 U/g für *A. oryzae*, E/S = 1 U/g für *C. laurentii* und parallele Kopplung, T = 55°C, n = 2 für *C. laurentii* und *A. oryzae* 0-3 h, n = 1 für *A. oryzae* 4 & 20 h, sequentielle Synthese mit *A. oryzae* und parallele Synthese. Modifizierte Versionen von Abbildung 4-37A publiziert als Fig. S3 (supplemental data) und von Abbildung 4-37B als Fig.1 in [CF3].

Das *C. laurentii*-Enzym weist mit einer maximalen GOS-Ausbeute von ca. 50 % in etwa die doppelte Transgalactosylierungsaktivität im Vergleich zum *A. oryzae*-Enzym (Ausbeute ca. 24 %) auf. Es ist ebenfalls in der Lage, nach bereits erfolgter GOS-Synthese mit *A. oryzae*, weitere GOS-Strukturen zu synthetisieren und somit die Ausbeute um weitere 20 % auf ca. 44 % zu steigern (Abbildung 4-37). Die Ausbeute bleibt jedoch unterhalb derer, die bei alleinigem Einsatz von *C. laurentii* erzielt wurde, sodass ein inhibierender Einfluss der Monosaccharide und/oder bestimmter von *A. oryzae* gebildeter

GOS-Strukturen nicht ausgeschlossen werden kann. Ein paralleler Einsatz beider Enzyme (Verhältnis 1:1) führte zu keiner Ausbeutesteigerung und/oder Zeitersparnis, die maximale Ausbeute wurde jedoch bei einem höheren Hydrolysegrad (82,8 % vs. 67,4 %) erzielt (Abbildung 4-37B). Anhand des Kurvenverlaufs (Abbildung 4-37A), ist eine wesentliche Steigerung der Ausbeute bei Verlängerung der Reaktionszeit nicht zu erwarten. Die sequenzielle Kopplung von *A. oryzae* nach 96-stündiger Synthese mit *C. laurentii* führte zu einem weiteren Lactose-, aber auch GOS-Abbau und verminderte somit die Gesamtausbeute nach nur 1 h um knapp 7 %. Der Glc/Gal-Faktor sinkt dabei von ca. 25 (96 h mit *C. laurentii*) auf 2,6 (weitere 3 h mit *A. oryzae*, siehe Abbildung A.7-32). Demnach wird verhältnismäßig mehr Galactose als Glucose freigesetzt, was durch den GOS-Abbau begründet werden kann.

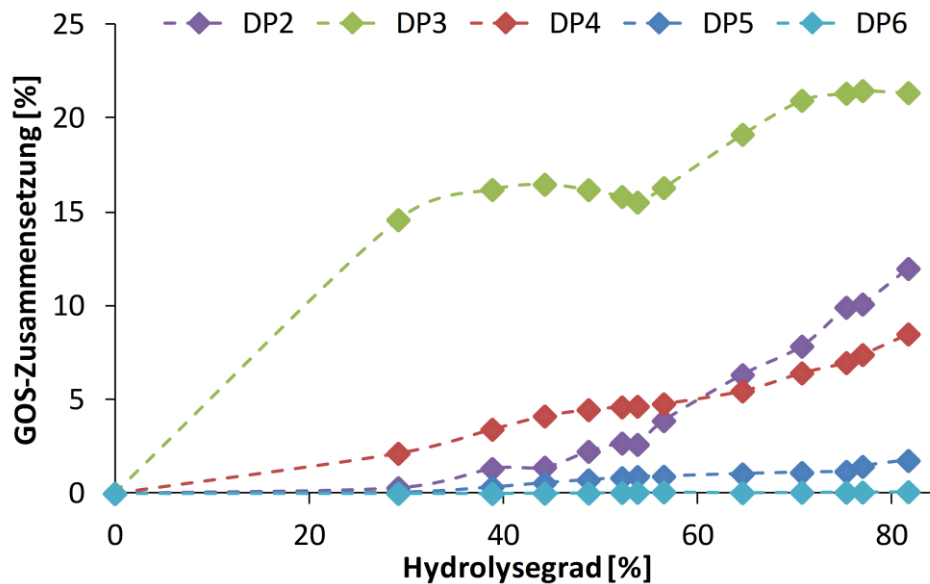


**Abbildung 4-38:** GOS-Zusammensetzung (DP = Polymerisationsgrad) in % des Gesamtzuckers in Abhängigkeit vom Hydrolysegrad bei sequentieller Kopplung von *C. laurentii* (96 h, ca. 64 % Hydrolyse) und *A. oryzae*. Die gestrichelte Linie markiert die maximale Ausbeute an GOS  $\geq$  DP4. Puffer: McIlvaine pH 4,5, ILC = 200 g/L, E/S = 1 U/g für *C. laurentii*, E/S = 50 U/g für *A. oryzae*, T = 55°C. Modifizierte Version publiziert als Fig. 2A in [CF3].

Bei näherer Betrachtung der GOS-Strukturen (Abbildung 4-38) findet durch *A. oryzae* allerdings nicht ausschließlich eine GOS-Hydrolyse, sondern auch der Aufbau längererkettiger GOS ( $\geq$  DP4) statt. Nach Zugabe des zweiten Enzyms aus *A. oryzae* findet ein abrupter Abbau der *C. laurentii*-Di- und -Trisaccharide statt, gleichzeitig steigt jedoch die Konzentration an Tetrasacchariden von 4,6 % auf bis zu 12,3 % nach weiteren 0,5 h Reaktionszeit. Gleiches gilt für Penta- (von 0,2 % auf max. 3,4 %) und Hexasaccharide (von 0 % auf max. 0,7 %). Somit wird der Galactosyl-Rest der hydrolysierten *C. laurentii*-Trisaccharide zumindest teilweise zum Aufbau neuer GOS-Verbindungen genutzt, was somit in einer erhöhten Strukturdiversität der GOS-Mischung resultiert. Dies wird auch in Abbildung 4-40A ersichtlich: Die Retentionszeit der von *A. oryzae* bzw. *C. laurentii* gebildeten Trisaccharide unterscheidet sich leicht (19 min bzw. 20 min), was auf Trisaccharide mit einer anderen glykosidischen Bindung hindeutet. Dies deckt sich mit Literaturangaben, nach denen *C. laurentii* vorrangig 4'-Galactosyllactose bildet [184] und *A. oryzae* die Bildung  $\beta(1\rightarrow6)$ -glykosidischer Bindungen bevorzugt [126]. Während die Konzentration der *C. laurentii*-Trisaccharide stark abnimmt (Peak bei



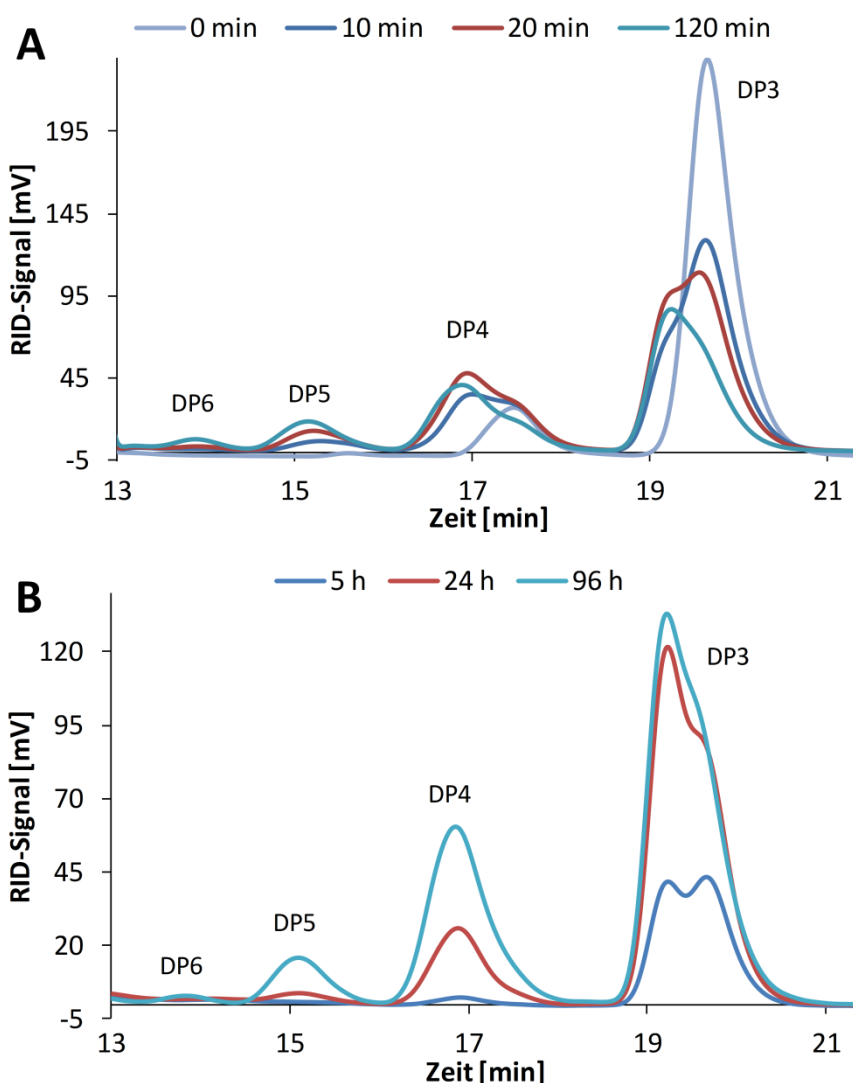
ca. 20 min in Abbildung 4-40A), scheinen die von *C. laurentii* gebildete Tetrasaccharide (Peak bei ca. 17,5 min in Abbildung 4-40A) hingegen nicht abgebaut zu werden (Peakschulter). Betrachtet man nur GOS mit einem DP  $\geq 4$ , so ist die Ausbeute im Vergleich zur alleinigen Synthese mit *C. laurentii* sogar erhöht (15,7 % nach 97 h vs. 7,0 % nach 168 h). Bezieht man die Trisaccharide mit ein, sinkt die Ausbeute leicht (35,3 % nach 97 h vs. 38,5 % nach 168 h).



**Abbildung 4-39:** GOS-Zusammensetzung (DP = Polymerisationsgrad) in % des Gesamtzuckers in Abhängigkeit vom Hydrolysegrad bei sequentieller Kopplung von *A. oryzae* (3 h, ca. 54 % Hydrolyse) und *C. laurentii*. Puffer: McIlvaine pH 4,5, ILC = 200 g/L, E/S = 1 U/g für *C. laurentii*, E/S = 50 U/g für *A. oryzae*, T = 55°C. Modifizierte Version publiziert als Fig. S2 (supplemental data) in [CF3].

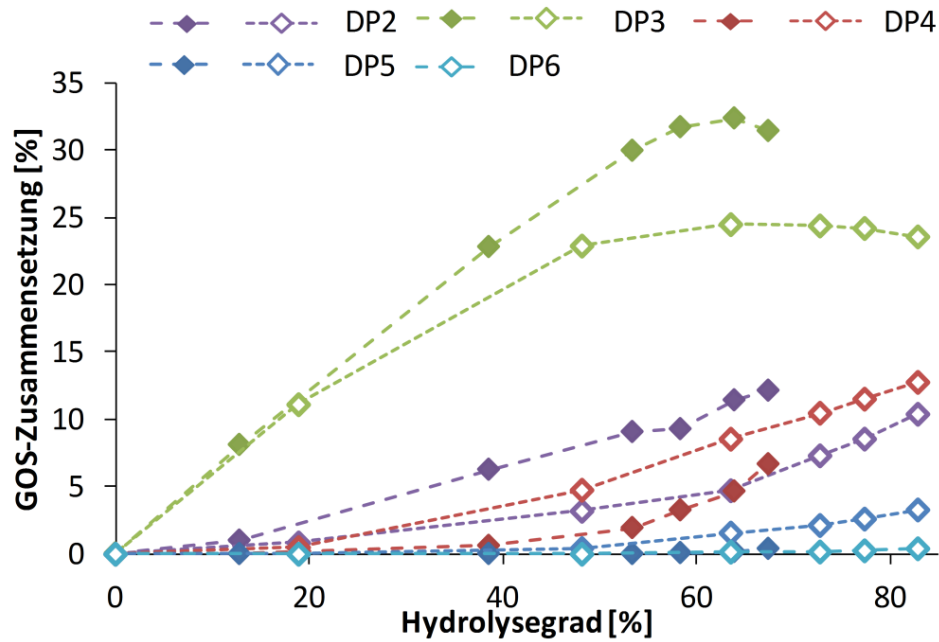
Für den umgekehrten Fall, d. h. die initiale Synthese mit *A. oryzae* und anschließende Behandlung mit *C. laurentii*, konnte die Gesamtausbeute wesentlich gesteigert werden, was auf einer Zunahme aller GOS-Klassen beruht (Abbildung 4-39). Hervorzuheben ist hier wiederum die beträchtliche Erhöhung der GOS-Disaccharidfraktion (von ca. 2,6 % auf 12,0 %), aber auch die Synthese von Tri- und Tetrasacchariden ist stark ausgeprägt (Anstieg um 5,9 % bzw. 3,9 %). Des Weiteren nimmt der Gehalt an freier Galactose von anfänglich 9,2 % (3 h mit *A. oryzae*) auf 8,1 % (weitere 168 h mit *C. laurentii*) ab, was – ähnlich wie bei den galactosehaltigen Sauermolkeproben – auf eine Bildung von Galactose-Galactose-Disacchariden schließen lässt. Somit steigt durch die sequentielle Enzymbehandlung auch der Glc/Gal-Faktor von 2,3 auf 3,7 (Abbildung A.7-32).



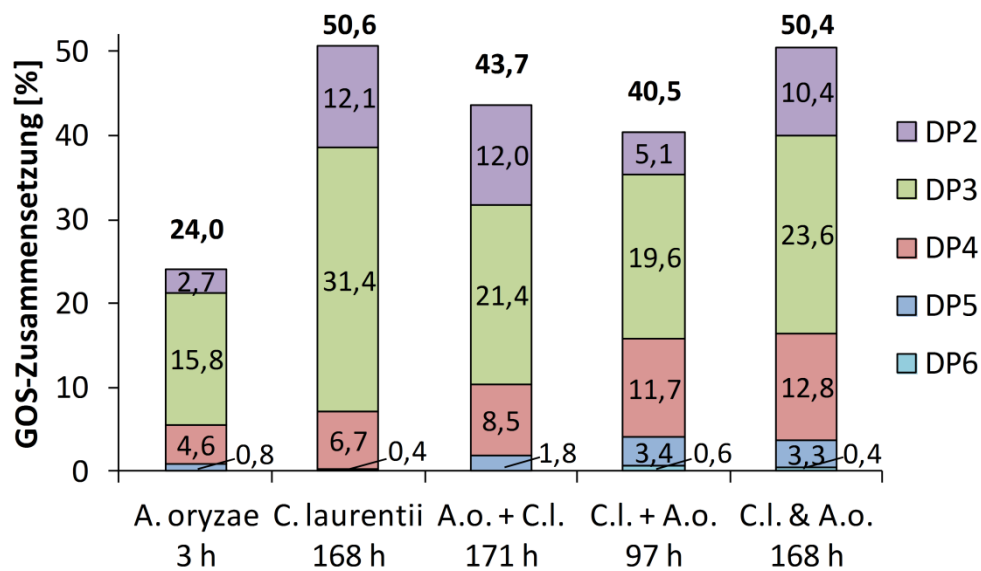


**Abbildung 4-40:** HPLC-Chromatogramme der GOS-Fractionen (DP = Polymerisationsgrad) auf der Hi-Plex Na-Säule für verschiedene Kombinationen von *A. oryzae* und *C. laurentii*. A: 96-stündige Synthese mit *C. laurentii* (0 min), anschließende Synthese mit *A. oryzae*, B: parallele Synthese mit *C. laurentii* und *A. oryzae*. Modifizierte Version publiziert als Fig. S4A und Fig. S4C (supplemental data) in [CF3].

Die höchste Ausbeute im Rahmen der Enzymkombination wurde jedoch bei parallelem Einsatz beider  $\beta$ -Galactosidasen erzielt. Trotz der im Vergleich zur alleinigen Synthese mit *C. laurentii* identischen Ausbeute von ca. 50 %, konnten wesentliche Unterschiede in der GOS-Zusammensetzung detektiert werden (Abbildung 4-41). Während Trisaccharide in beiden Fällen die Hauptfraktion darstellen, werden bei Verwendung des bienzymatischen Systems deutlich mehr Tetra-, Penta- und Hexasaccharide gebildet. Die Synthese von GOS-Disacchariden ist mit 12,1 % etwas stärker bei der alleinigen Synthese mit *C. laurentii* ausgeprägt (parallele Synthese: 10,4 %). Sind länger-kettige GOS-Strukturen erwünscht, so könnten sich die Kosten für den Einsatz eines zusätzlichen Enzyms trotz gleicher Gesamtausbeute also dennoch lohnen. Ebenso zeigt Abbildung 4-40B anhand des Trisaccharid-Peaks bei ca. 19-20 min, das durch die unterschiedliche Präferenz der Enzyme hinsichtlich der glykosidischen Bindungen, ein GOS-Produkt mit erhöhter Strukturdiversität, im Vergleich zur Synthese mit nur einem Enzym, erhalten wird.



**Abbildung 4-41:** GOS-Zusammensetzung (DP = Polymerisationsgrad) in % des Gesamtzuckers in Abhängigkeit vom Hydrolysegrad bei paralleler Synthese mit *A. oryzae* und *C. laurentii* (offene Symbole) und alleiniger Synthese mit *C. laurentii* (geschlossene Symbole). Puffer: McIlvaine pH 4,5, ILC = 200 g/L, E/S = 1 U/g, T = 55°C, n = 2 für *C. laurentii*, n = 1 für parallele Synthese. Modifizierte Version publiziert als Fig. 2B in [CF3].



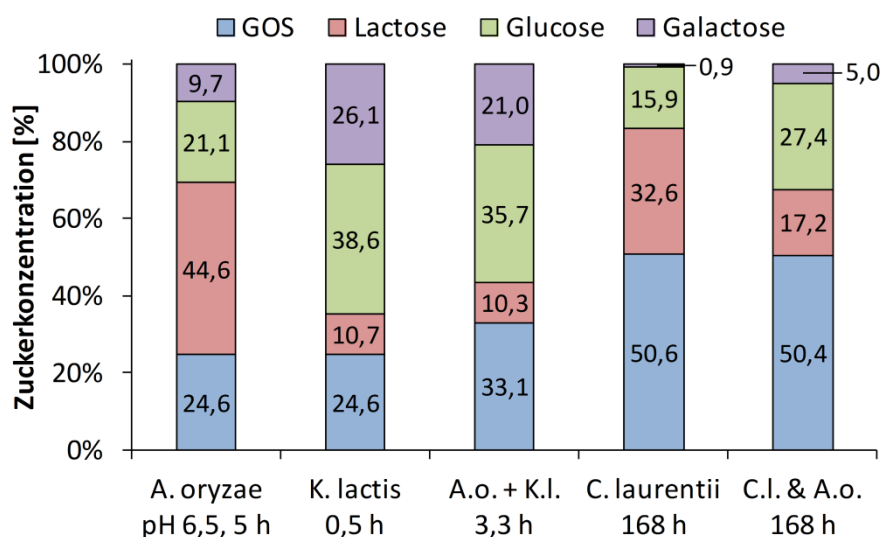
**Abbildung 4-42:** GOS-Zusammensetzung (DP = Polymerisationsgrad) in % des Gesamtzuckers in Abhängigkeit von verschiedenen Enzymkombinationen. Die Werte über den jeweiligen Balken entsprechen der Gesamtausbeute. DP6 ist für die Behandlungen „*A. oryzae* 3 h“ und „*A.o. + C.l.* 171 h“ < 0,1 % (nicht eingezeichnet) und konnte bei *C. laurentii* 168 h nicht nachgewiesen werden.

Abbildung 4-42 zeigt zusammenfassend die Zusammensetzung der GOS-Fraktion zum jeweiligen Zeitpunkt der maximalen GOS-Ausbeute bzw. für die sequentielle Kopplung *C. laurentii* – *A. oryzae* nach 97 h (Maximum GOS  $\geq$  DP4). Für die Maximierung des Anteils GOS  $\geq$  DP3 und GOS  $\geq$  DP4 ist es notwendig, beide Enzyme parallel einzusetzen. Gleichzeitig verringert sich somit auch der restliche

Lactosegehalt im Produkt (Abbildung 4-43). Trotz Verminderung der Gesamtausbeute von 50,6 % auf 40,5 %, kann eine kurze Behandlung mit dem Enzym aus *A. oryzae* nach Synthese mit *C. laurentii*, den Anteil an GOS  $\geq$  DP4 deutlich steigern (15,7 % vs. 7,0 %), allerdings bleibt die Ausbeute unter der der parallelen Prozessführung (16,5 %).

#### 4.3.7.3 Schlussfolgerungen

Die Synthese von Galactooligosacchariden durch Kombination mehrerer  $\beta$ -Galactosidasen birgt einiges Forschungspotenzial. Eine Steigerung der Ausbeute ist prinzipiell möglich, jedoch stark von den verwendeten Enzymquellen sowie der Prozessführung (parallel, sequentiell, Reihenfolge der Enzyme) abhängig. Mit beiden untersuchten Enzymkombinationen (sequentiell *A. oryzae* – *K. lactis*, parallel *C. laurentii* & *A. oryzae*) konnte der Anteil an GOS  $\geq$  DP3 gesteigert werden, was vorteilhaft bei einer eventuell gewünschten Aufreinigung (Entfernung von Glucose, Galactose, Lactose) der Zuckermischung ist, da damit einhergehende Verluste vor allem der GOS-Disaccharidfraktion zuzuschreiben sind [147, 182]. Zusätzlich wird der Anteil an Restlactose verringert und der Anteil an Glucose und Galactose entsprechend erhöht (Abbildung 4-43), was bei nachgeschalteter Entfernung der Monosaccharide (beispielsweise durch Hefefermentation) ebenfalls erwünscht sein kann.



**Abbildung 4-43:** Zusammensetzung der Reaktionslösung zum Zeitpunkt der maximalen GOS-Ausbeute in Abhängigkeit von verschiedenen Enzymquellen und –kombinationen (+ = sequentielle Kopplung, & = parallele Kopplung).

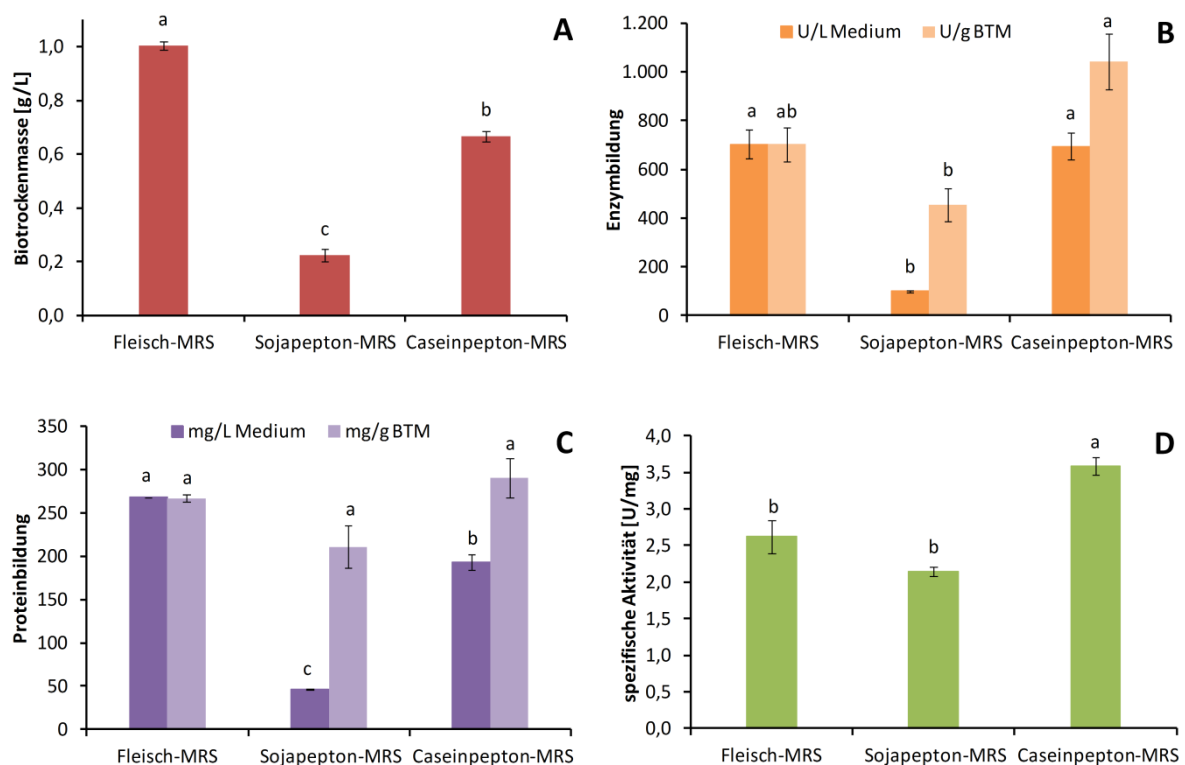
Für die sequentielle Kopplung von *A. oryzae* und *K. lactis* konnte die Ausbeute wie prognostiziert von 24,6 % auf 33,1 % gesteigert werden, was sich prinzipiell mit Literaturergebnissen [187, 188] deckt. Für die sequentielle Kombination der *A. oryzae*- und *C. laurentii*- $\beta$ -Galactosidasen war dies jedoch nicht möglich. Grund hierfür mag die inhibierende Wirkung der durch *A. oryzae* gebildeten Monosaccharide sein. Im Gegensatz zu *K. lactis* kann das *C. laurentii*-Enzym bereits im Reaktionsmix vorhandene Monosaccharide offenbar weniger gut als Akzeptormolekül nutzen. Diese These wird durch die Tatsache gestützt, dass bei *K. lactis* 53 % der gebildeten GOS Disaccharide sind, während der Anteil bei *C. laurentii* nur 24 % beträgt. Demnach scheint es im Hinblick auf eine Steigerung der Gesamt-GOS-Ausbeute sinnvoll, als zweites Enzym eines zu wählen, welches vorzugsweise GOS-Di-

saccharide synthetisiert. Aufgrund der generell höheren Transgalactosylierungsaktivität von *C. laurentii* (GOS/Gal-Faktor: 55,6) im Vergleich zu *K. lactis* (GOS/Gal-Faktor: 0,9), war die Gesamtausbeute bei der sequentiellen Synthese mit *A. oryzae* als erstes Enzym jedoch trotzdem mit *C. laurentii* (43,7 %) höher als mit *K. lactis* (33,1 %). Nichtsdestotrotz ist es – wie am Beispiel der parallelen Synthese mit *C. laurentii* und *A. oryzae* gezeigt – möglich, die Strukturdiversität der finalen GOS-Mischung zu erhöhen und damit ein möglicherweise wirksameres Produkt zu erhalten.

#### 4.4 Untersuchungen zur $\beta$ -Galactosidase-Synthese mit *L. bulgaricus* LB4

##### 4.4.1 Nährmedienumstellung auf kosher-/halal-zertifizierte Bestandteile

Um eine kosher- und halal-gerechte Produktion der  $\beta$ -Galactosidase aus *L. bulgaricus* LB4 zu ermöglichen, müssen die im Kulturmedium vorhandenen Fleisch enthaltenden Bestandteile, d. h. Fleischpepton und Fleischextraktpaste, durch alternative Rohstoffe ersetzt werden. In einem ersten Schritt wurden hierzu Soja- und Caseinpepton als mögliche Alternative zu Fleischpepton getestet. Die Fleischextraktpaste wurde ersatzlos gestrichen.



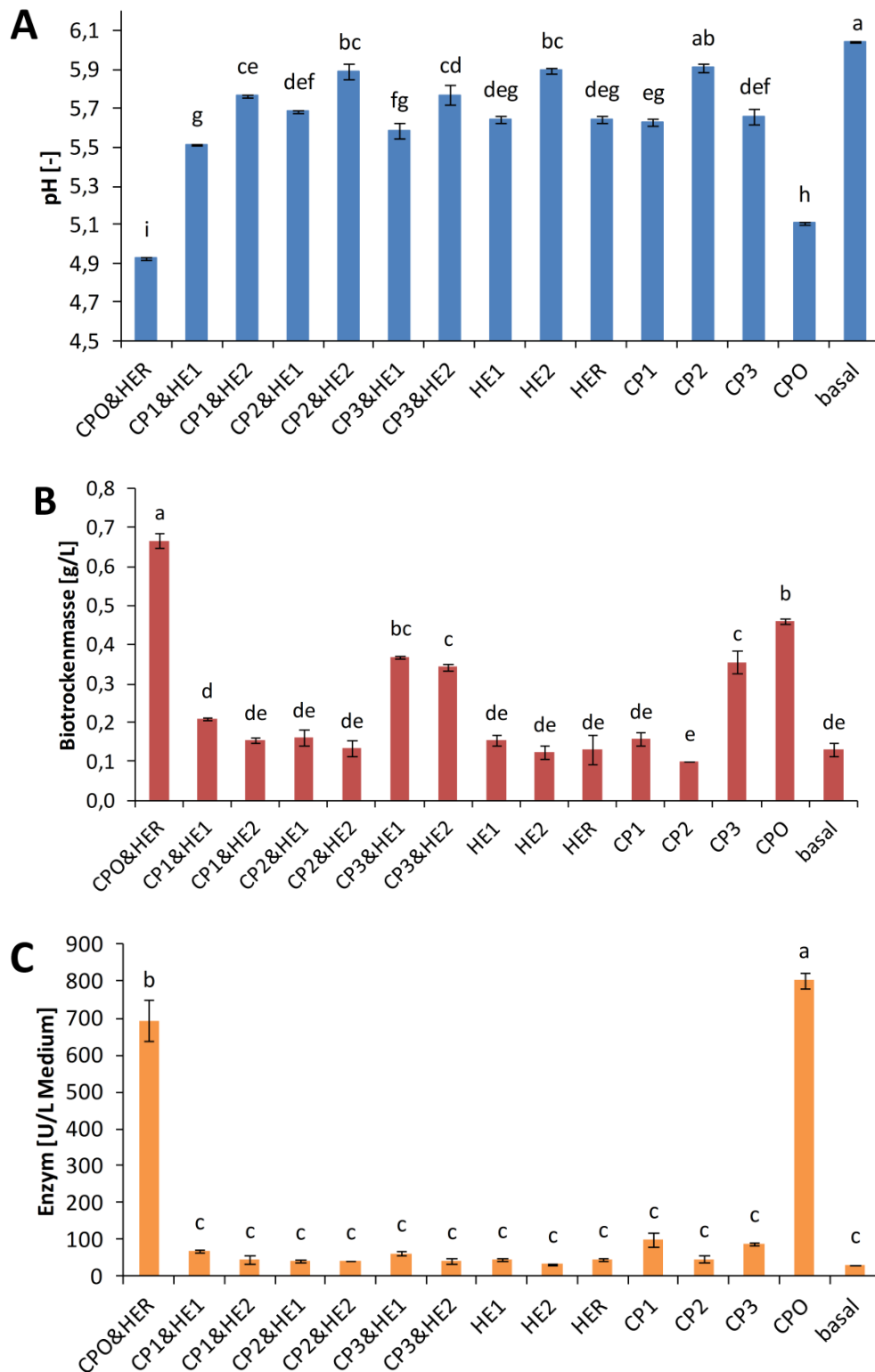
**Abbildung 4-44:** Einfluss der Substitution von Fleischpepton im Standard-MRS-Medium (Fleisch-MRS) mit Sojapepton bzw. Caseinpepton auf Wachstum (Biotrockenmasse) (A),  $\beta$ -Galactosidase-Synthese (B), Proteinbildung (C) und spezifische Enzymaktivität (D) mit *L. bulgaricus* LB4,  $n = 2$ . Unterschiedliche Buchstaben innerhalb einer Reihe implizieren Signifikanz (Tukey-HSD-Test,  $\alpha = 0,05$ ).

Das beste Mikroorganismenwachstum wurde im Standard-Medium erhalten, während der Austausch gegen Caseinpepton bzw. Sojapepton eine um 33 % bzw. 78 % verminderte Biotrockenmasse (BTM)-Bildung zur Folge hatte (Abbildung 4-44A). Allerdings war die  $\beta$ -Galactosidase-Ausbeute im Caseinpepton-MRS vergleichbar mit der des Standard-Mediums aufgrund einer höheren

Enzymsynthese in der Zelle (Abbildung 4-44B). Mit Sojapepton war sowohl die Syntheseleistung in der Zelle, als auch die absolute Enzymausbeute ( $\text{U/L}_{\text{Medium}}$ ) aufgrund des schlechteren Wachstums deutlich vermindert. Der Trend für die Synthese von Proteinen ist ähnlich, jedoch ist eine signifikante Erhöhung der spezifischen  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität von  $2,6 \text{ U/mg}_{\text{Protein}}$  im Fleisch-MRS auf  $3,6 \text{ U/mg}_{\text{Protein}}$  im Caseinpepton-MRS zu beobachten (Abbildung 4-44D), d. h. in letztgenanntem wird verhältnismäßig weniger Fremdprotein gebildet. In Summe stellt Caseinpepton somit einen adäquaten Ersatz für Fleischpepton und Fleischextrakt dar.

Da das für die Versuche in Abbildung 4-44 verwendete Caseinpepton von Otto Nordwald GmbH sowie der Hefeextrakt von Carl Roth GmbH & Co. KG keine kosher-/halal-Zertifizierung besitzen, wurden Produkte anderer Hersteller auf ihre Eignung untersucht. Zum Vergleich wurde ein basal-Medium ohne komplexe N-Quelle mitgeführt.

Wie zu erwarten, wuchs *L. bulgaricus* LB4 am schlechtesten im basal-Medium, in welchem Ammoniumcitrat die einzige verfügbare Stickstoffquelle darstellt (Abbildung 4-45B). Dies spiegelt sich auch im pH-Wert wider, welcher während der Fermentation um nur 0,2 Einheiten auf pH 6,0 sank und somit auf eine geringe Milchsäure-Bildung aufgrund eines schlechten Wachstums hindeutet. Hingegen wurde das beste Wachstum – und damit auch der niedrigste pH-Wert – im zuvor beschriebenen Caseinpepton-Medium (in Abbildung 4-45 als CPO&HER bezeichnet) erhalten. Tendenziell ist das Wachstum in den Kombinationen mit Hefeextrakt (HE) 2 etwas schlechter als in denen mit HE1, was auf eine bessere Aufnahme der in HE2 enthaltenen Peptide schließen lässt. Zu bemerken ist weiterhin, dass die Kombination von kosher-/halal-zertifizierten Caseinpeptonen (CP1-3) und Hefeextrakten (HE1-2) das Mikroorganismenwachstum gegenüber dem Einsatz nur eines dieser beiden Komponenten nicht verbessert. Im Gegensatz dazu führt die Kombination CPO&HER zu einem signifikanten Anstieg der Biotrockenmasse im Vergleich zum alleinigen Einsatz dieser Produkte. Des Weiteren fallen die verhältnismäßig hohen BTM-Werte für alle CP3-enhaltenden Kombinationen auf, welche gemäß des pH-Wertes nicht zu erwarten gewesen wären (siehe auch Abbildung A.7-34). Es wird vermutet, dass die scheinbar hohen BTM-Werte auf den unlöslichen Anteil ( $> 0,45 \mu\text{m}$ ) von CP3 zurückzuführen sind, welcher bei der Membranfilter-Methode mit erfasst wird. Neben CP3 löste sich auch das Produkt CP1 nicht vollständig, allerdings scheint der Einfluss auf die ermittelten BTM-Werte nur marginal zu sein (Partikel vermutlich  $< 0,45 \mu\text{m}$ ). Alle anderen Produkte lösten sich komplett (visuelle Betrachtung), sodass ein Fehler bei der BTM-Bestimmung ausgeschlossen werden kann.



**Abbildung 4-45:** Einfluss verschiedener Caseinpeptone (CP) und Hefeextrakte (HE) auf Medien-pH (A), Wachstum (B) und  $\beta$ -Galactosidase-Synthese (C) mit *L. bulgaricus* LB4, n = 2. Produktbezeichnungen: CPO = CP von Otto Nordwald, CP1 = CP von Organotechnie S.A.S., CP2 = CP von Solabia, CP3 = CP von TATUA/Sensient, HER = HE von Carl Roth, HE1 = HE von Bio Springer S.A., HE2 = HE von Ohly GmbH, basal = ohne CP, ohne HE. Unterschiedliche Buchstaben innerhalb einer Reihe implizieren Signifikanz (Tukey-HSD-Test,  $\alpha = 0,05$ ).

Aufgrund des generell sehr schlechten Wachstums war auch die Enzymausbeute (Abbildung 4-45C) mit allen kosher-/halal-zertifizierten Produkten äußerst gering. Die beste Rezeptur (CP1, ohne HE) lieferte  $98 \text{ U/L}_{\text{Medium}}$ , was sich jedoch nicht signifikant von den anderen kosher-/halal-gerechten Medien unterschied und in etwa 1/7 der Ausbeute des Kontrollmediums (CPO&HER) entspricht. Demnach kann keines der untersuchten Produkte als Ersatz für CPO bzw. HER dienen und eine kosher-/halal-gerechte Enzymproduktion ist auf diesem Weg nicht möglich. Zu bemerken ist jedoch, dass der alleinige Einsatz von CPO (ohne HE) mit ca.  $800 \text{ U/L}_{\text{Medium}}$  sogar zu einer etwas höheren Enzymausbeute führte. Dies ist gleichbedeutend mit einer gegenüber dem Kontrollmedium signifikant höheren Enzymproduktion in der Zelle (siehe Abbildung A.7-33A). Durch die unveränderte Synthese von Proteinen insgesamt (siehe Abbildung A.7-33B), ist die spezifische Enzymaktivität mit ca.  $6,1 \text{ U/mg}_{\text{Protein}}$  ebenfalls deutlich erhöht (siehe Abbildung A.7-33C).

Die Ursache für die stark unterschiedlichen Ergebnisse hinsichtlich Wachstum und Enzymbildung kann nur in den konkreten Produkteigenschaften vermutet werden. Ein Kriterium für die Stickstoffverfügbarkeit ist das AN/TN-Verhältnis, d. h. der Anteil von  $\alpha$ -Aminostickstoff (AN) am Gesamtstickstoff (TN) als Maß für den Hydrolysegrad des Produktes. Daneben galt es zu überprüfen, ob insgesamt starke Abweichungen im Gesamtstickstoffgehalt vorliegen, die bei gleichen Einwaagen (je  $10 \text{ g/L}$  für CP, je  $4 \text{ g/L}$  für HE) in einem unterschiedlichen Stickstoffangebot resultieren würden und somit ein schlechteres MO-Wachstum bedingen könnten.

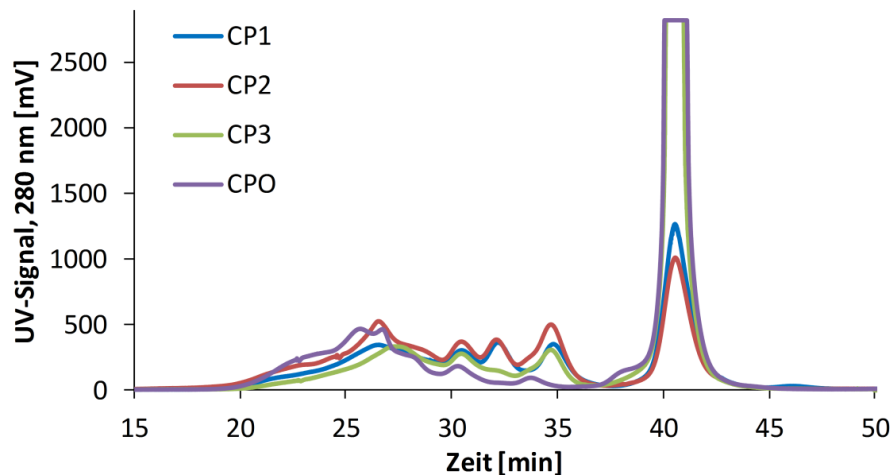
**Tabelle 4-14:** Charakterisierung der komplexen N-Quellen hinsichtlich AN/TN-Verhältnis\*.

Abk.	Produkt	Hersteller	TN <sup>a</sup> [%]	AN <sup>b</sup> [%]	AN/TN x 100 %
CP1	Caseinpepton	Organotechnie S.A.S.	$13,22^{bc} \pm 0,01$	$3,61^e \pm 0,07$	$27,3^e \pm 0,5$
CP2	Caseinpepton	Solabia	$12,43^{cd} \pm 0,01$	$3,20^f \pm 0,04$	$25,5^f \pm 0,3$
CP3	Caseinpepton	TATUA/Sensient	$13,86^b \pm 0,02$	$5,20^c \pm 0,07$	$37,9^c \pm 0,5$
CPO	Caseinpepton	Otto Nordwald	$13,94^b \pm 0,02$	$4,75^d \pm 0,09$	$34,1^d \pm 0,7$
HE1	Hefeextrakt	Bio Springer S.A.	$12,17^{de} \pm 0,04$	$5,80^b \pm 0,22$	$47,5^b \pm 1,8$
HE2	Hefeextrakt	Ohly GmbH	$12,09^{de} \pm 0,00$	$6,30^a \pm 0,03$	$52,0^a \pm 0,2$
HER	Hefeextrakt	Carl Roth	$11,39^e \pm 0,27$	$5,23^c \pm 0,14$	$45,9^b \pm 1,6$
SP	Sojapepton	Otto Nordwald	$9,32^f \pm 0,08$	$2,20^h \pm 0,07$	$23,7^g \pm 0,8$
FP	Fleischpepton	Fluka	$16,68^a \pm 0,33$	$2,78^f \pm 0,08$	$16,6^h \pm 0,6$
FE	Fleischextrakt	Carl Roth	$9,09^f \pm 0,24$	$0,81^g \pm 0,07$	$8,9^i \pm 0,8$

<sup>a</sup> Gesamtstickstoff (engl. *total nitrogen* (TN)) nach Kjeldahl,  $n = 2$ . <sup>b</sup>  $\alpha$ -Aminostickstoff (engl. *amino nitrogen* (AN)) nach OPA-Methode,  $n = 4$ . \* Werte in einer Spalte mit unterschiedlichem Exponent unterscheiden sich signifikant (Tukey-HSD-Test,  $\alpha = 0,05$ ).

Trotz zum Teil signifikanter Unterschiede zwischen den Produkten verschiedener Hersteller (Tabelle 4-14), lassen weder TN, noch das AN/TN-Verhältnis Rückschlüsse auf die besondere Eignung des Caseinpeptons von Otto Nordwald zu. Es ist insbesondere mit dem Produkt CP3 vergleichbar, welches jedoch deutlich schlechtere Ergebnisse lieferte. Es wird daher vermutet, dass Unterschiede in der konkreten Peptid-Zusammensetzung bestehen, die wiederum zu einer veränderten Stickstoffverfügbarkeit führen. Dies konnte beispielsweise für das Wachstum verschiedener *Lactobacillus*-

Stämme und der Verwendung von Fischhydrolysaten aus derselben Quelle, die jedoch mit verschiedenen Enzymen behandelt wurden, gezeigt werden. Durch die unterschiedlichen Enzymspezifitäten kam es somit zur Bildung anderer Peptide, die in einem unterschiedlich starken Mikroorganismenwachstum resultierten, trotz identischer Aminosäurezusammensetzung der Präparate [329].



**Abbildung 4-46:** Größenanalyse der Caseinpeptone (CP) mittels FPLC (Säule: Superose 12, Eluent: 50 mmol/L Na-Phosphat pH 6,2), je 0,2 g/mL. Legende: CP1 = CP von Organotechnie S.A.S., CP2 = CP von Solabia, CP3 = CP von TATUA/Sensient, CPO = CP von Otto Nordwald. Aprotinin (6,5 kDa) eluiert nach ca. 24,5 min (nicht gezeigt).

Abbildung 4-46 zeigt exemplarisch die Größenverteilung der bei pH 6,2 löslichen UV-aktiven Peptide in den verwendeten Caseinpeptonen. Als Markersubstanz wurde Aprotinin injiziert, welches bei ca. 24,5 min eluiert. Demnach ist der Großteil der auf diese Weise detektierten Peptide kleiner als 6,5 kDa. Eine exakte Größenbestimmung ist jedoch nicht möglich, da das verwendete Säulenmaterial nicht für die Peptidanalytik optimiert ist und kleinere Peptide somit nicht streng nach Größe eluieren. Unterschiede im Peptidmuster sind hauptsächlich bei den Peaks mit einer Retentionszeit von 32 min, 35 min und vor allem 41 min auszumachen, was auf eine unterschiedliche Pepsinbehandlung hindeutet. Die Konzentration an tendenziell kleineren Peptiden und/oder Aminosäuren, welche nach 41 min eluieren kann für CP1 und CP2 sowie für CP3 und CPO als vergleichbar angenommen werden, was mit dem größeren AN/TN-Verhältnis der letzten genannten konform ist (Tabelle 4-14). Demgegenüber scheinen im Fleischextrakt und Sojapepton vorrangig größere Peptide enthalten zu sein (vgl. Abbildung A.7-35). Beide N-Quellen erwiesen sich als eher ungeeignet für das Wachstum von *L. bulgaricus* LB4. Generell erlaubt aber auch diese Analytik keine genaue Aussage darüber, warum die kosher-/halal-zertifizierten Peptone das Mikroorganismenwachstum kaum fördern.

Da eine kosher-/halal-gerechte Enzymproduktion aufgrund der geringen BTM- und  $\beta$ -Galactosidase-Ausbeuten mit keinem der untersuchten Produkte möglich ist, wurde Magermilch getestet, welche bei entsprechender Zertifizierung als Produktionsmedium genutzt werden könnte. In Tabelle 4-15 ist die pH-Absenkung (als Maß für das Mikroorganismenwachstum) und die  $\beta$ -Galactosidase-Produktion im Vergleich zum Standard-MRS (inkl. Fleischpepton und Fleischextrakt) und Caseinpepton-MRS (CP von Otto Nordwald) dargestellt. Die deutliche pH-Reduktion um ca. 2 Einheiten lässt auf ein gutes Mikroorganismenwachstum schließen, welches signifikant besser ist als in beiden MRS-Medien. Die Enzymausbeute liegt mit ca. 950 U/L<sub>Medium</sub> über denen, welche in den MRS-Medien erhalten wurden,



wobei der Unterschied zum CP-MRS nicht signifikant ist. Die tendenziell höhere  $\beta$ -Galactosidase-Synthese kann vermutlich auf die höhere Lactosekonzentration zurückgeführt werden. Somit ist Milch prinzipiell als Produktionsmedium geeignet, was sich mit Literaturangaben deckt [53, 330].

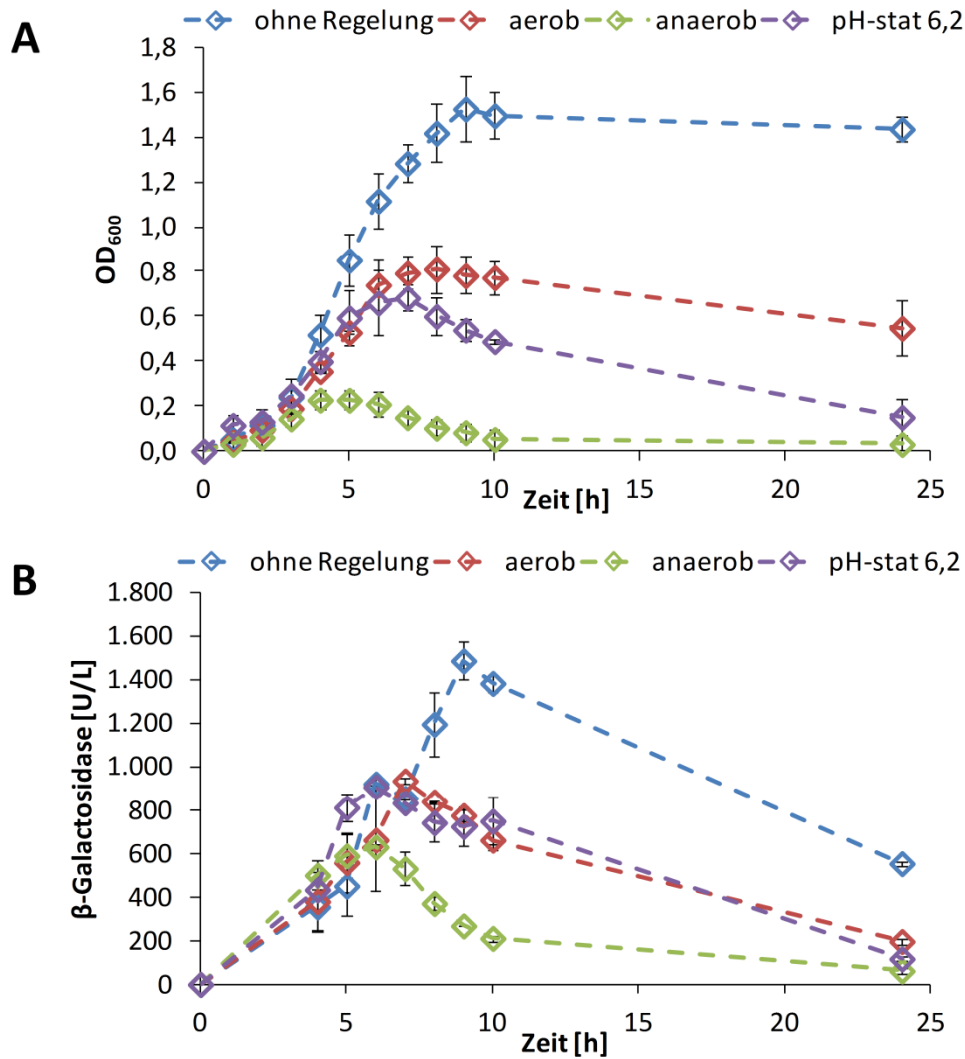
**Tabelle 4-15:** Vergleich der Enzymausbeute und der pH-Reduktion als Wachstumsindikator in Standard- und Caseinpepton-MRS (CPO, ohne Hefeextrakt) sowie Magermilch\*.

Medium	Start-pH	End-pH	$\Delta$ pH	$\beta$ -Galactosidase [U/L <sub>Medium</sub> ]
Standard-MRS <sup>a</sup>	6,2	4,69 <sup>b</sup> $\pm$ 0,02	1,51 <sup>b</sup> $\pm$ 0,02	703 <sup>b</sup> $\pm$ 60
Caseinpepton-MRS <sup>a</sup>	6,2	5,11 <sup>a</sup> $\pm$ 0,01	1,09 <sup>c</sup> $\pm$ 0,01	803 <sup>ab</sup> $\pm$ 21
Magermilch <sup>b</sup>	6,66	4,71 <sup>b</sup> $\pm$ 0,04	1,95 <sup>a</sup> $\pm$ 0,04	948 <sup>a</sup> $\pm$ 71

<sup>a</sup> enthält 20 g/L Lactose, n = 2. <sup>b</sup> enthält ca. 48 g/L Lactose, n = 6. \* Werte in einer Spalte mit unterschiedlichem Exponent unterscheiden sich signifikant (Tukey-Kramer-Test,  $\alpha$  = 0,05).

#### 4.4.2 Kultivierung im Fermentormaßstab

Mittels Hochschichtagar konnte *L. bulgaricus* LB4 als fakultativ anaerob eingestuft werden (Wachstum auf der Oberfläche und entlang des gesamten Stichkanals, nicht gezeigt). Da eine Kontrolle bzw. Messung von pH-Wert und Gelöstsauerstoff im Schüttelkolben-Maßstab nicht möglich war, sollten diese Parameter und deren Einfluss auf Wachstum und Enzymbildung im Biofermentor näher untersucht werden. Neben einer dem Schüttelkolben ähnlichen Fermentation ohne Regelung von pH-Wert und/oder Sauerstoff, wurden die O<sub>2</sub>-Extrembedingungen kontinuierliche Begasung mit Luft (aerobe Bedingungen) bzw. Stickstoff (anaerobe Bedingungen) untersucht. Ebenso erfolgte eine Kultivierung bei pH-Konstanz.



**Abbildung 4-47:** Wachstum (OD<sub>600</sub>, A) und β-Galactosidase-Synthese pro Liter Kulturmedium (B) von *L. bulgaricus* LB4 im Fermentormaßstab (1 L), n = 2. Für BTM-, pH- und pO<sub>2</sub>-Verlauf siehe Abbildung A.7-36.

Trotz häufigeren Einsatzes in der Literatur [55, 331] resultierte die Fermentation unter anaeroben Bedingungen mit *L. bulgaricus* LB4 im schlechtesten Wachstum (Abbildung 4-47A) mit einer maximalen BTM-Konzentration von 0,33 g/L (Tabelle 4-16). Demgegenüber lieferte die Kultivierung unter aeroben Bedingungen eine deutlich höhere BTM-Ausbeute von 0,63 g/L. Die besten Wachstumsbedingungen ergaben sich jedoch unter unkontrollierten Bedingungen mit einer maximalen BTM von 0,94 g/L. Auch für den Stamm *L. bulgaricus* DSM20081 erwies sich ein mikroaerophiles Milieu (< 4 % Sättigung) gegenüber strikt anaeroben Bedingungen als vorteilhaft hinsichtlich Ausbeute und Produktivität der BTM-Bildung. Höhere Sauerstoffkonzentrationen wurden jedoch nicht untersucht [332]. Die pH-Stat-Kultivierung (ohne O<sub>2</sub>-Regulierung) lieferte mit 0,67 g/L vergleichbare Biotrockenmassen wie unter aktiver O<sub>2</sub>-Begasung, jedoch signifikant geringere Ausbeuten als im Kontrollversuche ohne Regelung. Dies ist konform mit Ergebnissen für den Stamm *L. bulgaricus* Q7, wo Wachstumsrate und BTM bei der pH-ungeregelten Fermentation höher waren als in der pH-kontrollierten (pH 6,1) Fermentation [333]. Im Gegensatz dazu konnte für *L. bulgaricus* WICC-B-02 eine Steigerung der BTM von 4,9 g/L auf 6,4 g/L bei Kultivierung unter pH-Konstanz (pH 6,5) erzielt werden [334].

**Tabelle 4-16:** Wachstumsparameter und Enzymausbeuten von *L. bulgaricus* LB4 unter verschiedenen Fermentationsbedingungen (n = 2)\*.

	Ohne Regelung	Aerob	Anaerob	pH-Stat 6,2
<b>BTM<sub>max</sub> [g/L]</b>	0,94 <sup>a</sup> ± 0,05	0,63 <sup>b</sup> ± 0,05	0,33 <sup>c</sup> ± 0,03	0,67 <sup>b</sup> ± 0,02
<b>μ<sub>max</sub> [1/h]<sup>a</sup></b>	0,77 <sup>a</sup> ± 0,01	0,73 <sup>a</sup> ± 0,04	0,85 <sup>a</sup> ± 0,20	0,60 <sup>a</sup> ± 0,15
<b>Y<sub>P,max</sub> [U/L]</b>	1.486 <sup>a</sup> ± 86	936 <sup>b</sup> ± 14	629 <sup>c</sup> ± 13	908 <sup>b</sup> ± 10
<b>Y<sub>PX</sub> [U/g<sub>BTM</sub>]<sup>b</sup></b>	1.616 <sup>a</sup> ± 12	1.557 <sup>a</sup> ± 202	1.927 <sup>a</sup> ± 213	1.626 <sup>a</sup> ± 104
<b>RZA [U/L·h]<sup>c</sup></b>	165 <sup>a</sup> ± 10	134 <sup>bc</sup> ± 2	105 <sup>c</sup> ± 2	151 <sup>ab</sup> ± 2
<b>Y<sub>PrX</sub> [mg<sub>Protein</sub>/g<sub>BTM</sub>]<sup>d</sup></b>	296 <sup>a</sup> ± 17	278 <sup>ab</sup> ± 33	157 <sup>b</sup> ± 19	249 <sup>ab</sup> ± 6
<b>spez. EA [U/mg]<sup>e</sup></b>	5,5 <sup>b</sup> ± 0,3	5,6 <sup>b</sup> ± 0,1	12,3 <sup>a</sup> ± 0,1	6,5 <sup>b</sup> ± 0,3

<sup>a</sup> maximale spezifische Wachstumsrate berechnet aus OD<sub>600</sub> im Bereich 1–4 h für die Versuche ohne Regelung und unter anaeroben Bedingungen, im Bereich 1–3 h für die Versuche unter anaeroben Bedingungen und im Bereich 2–4 h für die Versuche unter pH-Stat-Bedingungen ( $R^2 \geq 0,97$ ). <sup>b</sup> Ausbeute an Produkt β-Galactosidase (P) bezogen auf die gebildete BTM (X) zum Zeitpunkt maximaler Enzymausbeute. <sup>c</sup> Raum-Zeit-Ausbeute zum Zeitpunkt maximaler Enzymausbeute. <sup>d</sup> Proteinsynthese zum Zeitpunkt maximaler Enzymausbeute. <sup>e</sup> spezifische Enzymaktivität zum Zeitpunkt maximaler Enzymausbeute. \* Werte in einer Zeile mit unterschiedlichem Exponent unterscheiden sich signifikant (Tukey-HSD-Test, α = 0,05).

Auch für die Synthese von β-Galactosidase erwiesen sich unkontrollierte Bedingungen mit einer Ausbeute von 1.486 U/L<sub>Medium</sub> als beste Option (Tabelle 4-16, Abbildung 4-47B). Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch Tari et al. [335] mit *L. bulgaricus* 77, bei dem eine auf pH 6,2 geregelte Kultivierung in einer um ca. 1/3 niedrigeren β-Galactosidase-Ausbeute im Vergleich zur unkontrollierten Fermentation resultierte. Zu bemerken ist weiterhin, dass unter anaeroben Bedingungen deutlich weniger Fremdproteine synthetisiert wurden, was somit in der höchsten spezifischen Enzymaktivität von 12,3 U/mg<sub>Protein</sub> resultiert, da die Enzymsynthese in der Zelle nicht von den untersuchten Bedingungen beeinflusst wird (vgl. U/g<sub>BTM</sub>). Die Produktivität (RZA) unter unkontrollierten und pH-Stat-Bedingungen unterscheidet sich nicht signifikant und beträgt ca. 150–165 U/L·h.

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

Galactooligosaccharide sind aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu den Oligosacchariden der humanen Muttermilch und ihrer damit verbundenen prebiotischen Wirkung seit etwa 30 Jahren Gegenstand zahlreicher Forschungsarbeiten. In der jüngeren Vergangenheit hat die Verwendung von komplexeren Substraten wie Milch und Molke zunehmendes Interesse erlangt (siehe Abbildung A.7-3), letzteres vor allem mit dem Ziel der Wertsteigerung von Abfallströmen der Molkereiindustrie.

Durch die Transgalactosylierungsreaktion des Enzyms  $\beta$ -Galactosidase können als Nebenprodukt der Lactosehydrolyse GOS synthetisiert werden. Die maximal erzielbare Ausbeute wird maßgeblich von der verwendeten Enzymquelle und der initialen Lactosekonzentration beeinflusst. Weitere Parameter wie pH-Wert und Temperatur spielen – sofern keine Enzyminaktivierung eintritt – nur eine untergeordnete Rolle. Aufgrund der Beeinflussung des Enzyms durch das umgebende Medium in Form von Ionen und/oder Proteinen konnte in einigen bisher veröffentlichten Arbeiten gezeigt werden, dass Ergebnisse, die in Puffer erhalten wurden, nicht auf Molke bzw. Milch übertragbar sind.

Der Fokus der vorliegenden Arbeit lag auf der Nutzung von Süß- und Sauermolke als Synthesemedium für Galactooligosaccharide unter Verwendung kommerzieller und nicht-kommerzieller  $\beta$ -Galactosidasen. Dabei wurden folgende Erkenntnisse gewonnen:

- 1.) Die  $\beta$ -Galactosidase aus *K. lactis* wird stark vom umgebenden Medium beeinflusst. Hierbei spielt nicht nur das Verhältnis der Milchsäure untereinander (Vergleich Süßmolke und Sauermolke), sondern auch deren absolute Konzentration (Vergleich Süßmolke und konzentrierte Süßmolke) eine entscheidende Rolle. Die Ausbeute in Lösungen niedriger Lactosekonzentration ( $< 50$  g/L) lag Medien-abhängig zwischen 4–11 %. Bei der Verwendung von Süß- bzw. Sauermolkekonzentraten mit 300 g/L Lactose konnten mit Puffer vergleichbare Ausbeuten von über 30 % erzielt werden. Die maximale Ausbeute wird unabhängig von der Lactosekonzentration bei einem Hydrolysegrad von ca. 90 % erreicht.
- 2.) Die  $\beta$ -Galactosidase aus *A. oryzae* wird nicht wesentlich vom verwendeten Medium beeinflusst. Ergebnisse mit gepufferten Lactoselösungen lassen sich daher auf Süß- und Sauermolke übertragen. Die GOS-Ausbeute liegt bei ca. 11 % ( $< 50$  g/L ILC) bis 25 % (200 g/L ILC). Die maximale Ausbeute wird in Abhängigkeit von der initialen Lactosekonzentration bei einem Hydrolysegrad von ca. 30–50 % erreicht. Bei galactosehaltigen Molken kommt es aufgrund kompetitiver Hemmung zu einer zeitlich verlangsamten Synthese und geringeren Ausbeuten.
- 3.) Die  $\beta$ -Galactosidase aus *L. bulgaricus* LB4 eignet sich mit Ausbeuten von über 20 % hervorragend für die GOS-Synthese in Lactoselösungen niedriger Konzentration. Die Ausbeute in Süßmolke ist im Vergleich zum Puffer etwas vermindert, generell kann man jedoch von einer guten Übertragbarkeit der Ergebnisse sprechen und damit einer geringen Beeinflussung durch die Molkebestandteile. Die hydrolytische Aktivität des Enzyms ist mit einem Lactoseumsatz von etwa 70–80 % zum Zeitpunkt der maximalen Ausbeute relativ hoch und damit vergleichbar zu *K. lactis*. In der vorliegenden Arbeit konnte eine ausgeprägte Abhängigkeit der gebildeten GOS-Strukturen und damit letztendlich auch der Gesamtausbeute von der Synthesetemperatur (10–50°C) gefunden werden, welche für Puffer und Süßmolke gleichermaßen gilt. Niedrigere Temperaturen führen zur vermehrten Bildung von GOS-Disacchariden und somit insgesamt zu einer

Steigerung der Ausbeute. Sind jedoch vornehmlich Tri- und höhere Oligosaccharide von Interesse, so ist eine Reaktionstemperatur von 50°C vorzuziehen. Die Ausbeute liegt jedoch auch bei 10°C mit ca. 15–16 % (GOS  $\geq$  DP3: ca. 10–11 %) über der mit *A. oryzae* bzw. *K. lactis* erreichbaren.

- 4.) Die  $\beta$ -Galactosidase aus *C. laurentii* besitzt mit einer Lactose-zu-GOS-Rate von etwa 60 % mit Abstand die höchste Transgalactosylierungsaktivität der in dieser Arbeit untersuchten Enzyme. Die Ausbeute der GOS  $\geq$  DP3 liegt bei über 35 % und wird nicht von der anfänglichen Lactosekonzentration (40–200 g/L) beeinflusst. Unter Einbeziehung der GOS-Disaccharide, wurde eine Ausbeute von ca. 50 % bestimmt. Auch hier ist die Übertragbarkeit von GOS-Ausbeute und GOS-Zusammensetzung zum System Sauermolke gegeben. Milchsäure und Molkenproteine wirken damit in Summe nicht inhibierend. Auch die Verwendung galactosehaltiger Molken mindert die Ausbeute nicht, beeinflusst jedoch die GOS-Zusammensetzung durch die potenzielle Bildung von Di- und Tri-Galactosen.

Zusammenfassend erlauben die zu *K. lactis* und *A. oryzae* alternativen Enzymquellen aus *L. bulgaricus* bzw. *C. laurentii* eine gute Übertragung der mit Puffer erzielten Ergebnisse auf die Substrate Süß- bzw. Sauermolke und liefern zudem deutlich höhere Ausbeuten. Die eingangs aufgestellte These, dass das Substrat Molke  $\beta$ -Galactosidasen verschiedenen Ursprungs unterschiedlich stark in ihrer Transgalactosylierungsaffinität beeinflusst, konnte somit bestätigt werden. Im Ergebnis ließe sich Molke somit einer ganzheitlichen Wertschöpfung unterziehen, woraus wiederum neue Produkte entwickelt werden können.

Zudem wurden weitere Strategien zur Maximierung der GOS-Ausbeute evaluiert, welche bisher wenig Beachtung in der wissenschaftlichen Fachliteratur fanden. Zum Einfluss der parallelen Glucose-Entfernung durch enzymatische Oxidation mit Hilfe von Glucose-Oxidase/Katalase können folgende Aussagen getroffen werden:

- 1.) In Kombination mit  $\beta$ -Galactosidase aus *A. oryzae* lässt sich die Ausbeute nicht signifikant steigern. Die Lösung wird zwar um den Faktor 1,35 aufgereinigt, durch die moderate Hydrolyseaktivität verbleibt jedoch ein hoher Restlactosegehalt im Produkt und der GOS-Anteil erhöht sich von ca. 25 % auf lediglich ca. 33 %.
- 2.) In Kombination mit  $\beta$ -Galactosidase aus *K. lactis* wird die Gesamtausbeute von ca. 24 % auf ca. 15 % verringert, da Glucose als Galactosyl-Akzeptor entzogen wird und somit signifikant weniger GOS-Disaccharide synthetisiert werden. Auch der Lactoseabbau ist vermindert, sodass ein höherer Restgehalt im Endprodukt verbleibt.
- 3.) Tendenziell nimmt die Ausbeute an höheren GOS ( $\geq$  DP3) zu, war jedoch für die beiden untersuchten  $\beta$ -Galactosidasen aus *K. lactis* und *A. oryzae* nicht signifikant. Eine parallel zur Synthese stattfindende Entfernung von Glucose scheint nur für solche Enzyme sinnvoll, die vorrangig Tri- und höhere Oligosaccharide bilden, d. h. die eine starke Affinität für Disaccharide (und damit vorrangig Lactose) als Galactosyl-Akzeptoren zeigen. Andernfalls lohnt der zusätzlich Aufwand (GOX, KAT, Begasung) bei der Synthese nicht.

Somit konnte die eingangs aufgestellte These, dass der Entzug von Glucose während der GOS-Synthese zu einer Ausbeutesteigerung führt, aus den zuvor genannten Gründen nicht bestätigt werden.

Die Kombination mehrerer  $\beta$ -Galactosidasen brachte folgende Ergebnisse:

- 1.) Die Reihenfolge der Enzyme spielt bei der sequentiellen Kombination eine essentielle Rolle.
- 2.) Die Verwendung von *A. oryzae*- $\beta$ -Galactosidase als zweites Enzym führte sowohl bei vorangegangener Synthese mit *K. lactis* als auch mit *C. laurentii* zur Verringerung der Gesamtausbeute. Durch den Aufbau weiterer Tetrasaccharide konnte jedoch auch eine weiterhin bestehende Transferaktivität dieses Enzyms nachgewiesen werden.
- 3.) Beim sequentiellen Einsatz von *A. oryzae* – *K. lactis* konnte die Ausbeute von ca. 25 % auf ca. 33 % gesteigert werden, vorrangig aufgrund der Synthese neuer GOS-Disaccharide aus den von *A. oryzae* freigesetzten Monosacchariden.
- 4.) Der parallele Einsatz von *A. oryzae* und *C. laurentii* führte zu einem leichten Anstieg von GOS  $\geq$  DP3, jedoch zu keiner Steigerung der Gesamtausbeute.
- 5.) Durch die Kombination mehrerer  $\beta$ -Galactosidasen kann die Strukturdiversität von GOS-Mischungen erhöht werden.

In Summe konnte die zu Beginn aufgestellte These somit zum großen Teil bestätigt werden. In Abhängigkeit von der verwendeten Enzymkombination ist eine Steigerung der Ausbeute prinzipiell möglich (Ergebnisse mit *A. oryzae* und *K. lactis*) und auch eine Erhöhung der Strukturdiversität konnte nachgewiesen werden (Ergebnisse mit *A. oryzae* und *C. laurentii*). In Abhängigkeit von der konkreten Zielsetzung (z. B. dem erwünschten Anteil einzelner GOS-Fractionen) kann es daher lohnenswert sein, die GOS-Synthese mit mehreren Enzymen durchzuführen. Zuvor bedarf es jedoch einer detaillierten Analyse des Einflusses der Prozessführung (sequentielle Synthese inklusive Enzymreihenfolge oder parallele Synthese).

Eine  $\beta$ -Galactosidase aus *C. laurentii* wird bereits für die Herstellung eines GOS-Produktes (Cup-Oligo®) verwendet, womit die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse industriell realisierbar scheinen und auch die Produktion des entsprechenden Enzyms bereits im Industriemaßstab durchgeführt wird. Eine  $\beta$ -Galactosidase aus *L. bulgaricus* findet derzeit noch keine industrielle Anwendung, sodass erste Untersuchungen zur Herstellung dieses Enzyms im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden. Hierfür können folgende Kernaussagen getroffen werden:

- 1.) Eine kosher- bzw. halal-gerechte Produktion ist mit den getesteten Produkten (Caseinpeptone, Hefeextrakte) nicht möglich. Alternativ wäre eine Synthese in entsprechend zertifizierter Milch prinzipiell möglich, bedarf jedoch weiterer Untersuchungen.
- 2.) Das beste Mikroorganismenwachstum sowie die höchste Enzymausbeute wurde bei unkontrollierter Fermentation (keine pH- oder  $pO_2$ -Regelung) erreicht.

In zukünftigen Arbeiten sollte aufbauend auf den genannten Erkenntnissen, die prebiotische Wirksamkeit der erzeugten GOS-Mischungen im Fokus stehen. Beispielsweise wäre zu eruieren, ob eine Erhöhung der Strukturdiversität, wie sie durch die Kombination mehrerer Enzyme erhalten wurde, auch in verbesserten prebiotischen Eigenschaften resultiert. Auch eine detailliertere Analyse der erzeugten GOS-Strukturen wäre wünschenswert, um weitere Optimierungsstrategien ableiten zu können. Weiterhin sollte überprüft werden, ob sich die hohen GOS-Ausbeuten, welche unter

Nutzung ganzer Zellen von *C. laurentii* erhalten wurden, auch mit einem freien Enzym reproduzieren lassen. Ebenso wäre die Applikation des *L. bulgaricus*-Enzyms in konzentrierter Molke potenziell von industriellem Interesse. Für die industrielle Übertragbarkeit ist auch eine Optimierung der Produktion des *L. bulgaricus*-Enzyms von Bedeutung. Hier stehen vor allem die Anpassung der Nährmedienszusammensetzung im Vordergrund sowie ein entsprechendes Scale-Up.

Generell stellt die Synthese sogenannter Sia-GOS, d. h. die Anknüpfung von Sialinsäure, einen vielversprechenden Forschungsansatz dar, da diese modifizierten GOS prebiotische Eigenschaften aufweisen, die bis dato erhältliche GOS-Mischungen nicht haben. Somit ließe sich eine höhere strukturelle Ähnlichkeit zu den HMOS erzeugen, deren Anwendung vor allem in der Säuglings- und Kleinkindnahrung von Interesse ist. Die bisherigen Untersuchungen waren vorrangig grundlegender Natur, sodass sich in diesem Bereich viele Forschungsmöglichkeiten ergeben. Beispielsweise wäre ein paralleler Einsatz der beiden Enzyme ( $\beta$ -Galactosidasen und trans-Sialidase bzw. Sialyltransferase) unter Verwendung von Caseinmakropeptid als Sialinsäure-Donor eine vielversprechende Möglichkeit, an bisherige Forschungen anzuknüpfen und somit die GOS-Synthese und die GOS-Modifizierung in einem Prozessschritt zu kombinieren. In diesem Zusammenhang wäre auch die Nutzung von CMP-haltiger Süßmolke als Synthesemedium interessant.

## 6 Literaturverzeichnis

- [1] K. Wallenfels (1951). Enzymatische Synthese von Oligosacchariden aus Disacchariden. *Die Naturwissenschaften*, 38 (13), 306-307.
- [2] M. Aronson (1952). Transgalactosidation during lactose hydrolysis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 39 (2), 370-378.
- [3] Z. Mozaffar, K. Nakanishi & R. Matsuno (1985). Formation of Oligosaccharides During Hydrolysis of Lactose in Milk Using  $\beta$ -Galactosidase from *Bacillus circulans*. *Journal of Food Science*, 50, 1602-1606.
- [4] J.E. Prenosil, E. Stuker & J.R. Bourne (1987). Formation of Oligosaccharides during enzymatic Lactose Hydrolysis and their Importance in a Whey Hydrolysis Process: Part II. Experimental. *Biotechnology and Bioengineering*, 30 (9), 1026-1031.
- [5] A. Burvall, N.G. Asp & A. Dahlqvist (1980). Oligosaccharide formation during hydrolysis of lactose with *Saccharomyces lactis* lactase (Maxilact®)-Part 3: Digestibility by human intestinal enzymes in vitro. *Food Chemistry*, 5 (3), 189-194.
- [6] R. Tanaka, H. Takayama, M. Morotomi, T. Kuroshima, S. Ueyama, K. Matsumoto, A. Kuroda & M. Mutai (1983). Effects of Administration of TOS and *Bifidobacterium breve* 4006 on the Human Fecal Flora. *Bifidobacteria Microflora*, 2 (1), 17-24.
- [7] K. Ohtsuka, Y. Benno, K. Endo, H. Ueda, O. Ozawa, T. Uchida & T. Mitsuoka (1989). Effects of 4'-galactosyllactose intake on human fecal microflora. *Bifidus*, 2, 143-149.
- [8] Z. Mozaffar, K. Nakanishi & R. Matsuno (1986). Continuous production of galacto-oligosaccharides from lactose using immobilized  $\beta$ -galactosidase from *Bacillus circulans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 25 (3), 224-228.
- [9] G.R. Gibson & M.B. Roberfroid (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*, 125 (6), 1401-1412.
- [10] Anonym (2006). Verordnung (EG) Nr. 1924/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 20. Dezember 2006 über nährwert- und gesundheitsbezogene Angaben über Lebensmittel. Europäische Gemeinschaft.
- [11] Anonym (2018). EU Register on nutrition and health claims. Online unter: [http://ec.europa.eu/food/safety/labelling\\_nutrition/claims/register/public/?event=search](http://ec.europa.eu/food/safety/labelling_nutrition/claims/register/public/?event=search), zugegriffen am 2.10.2018.
- [12] Anonym (2011). Verordnung (EU) Nr. 1169/2011 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 25. Oktober 2011 betreffend die Information der Verbraucher über Lebensmittel. Europäische Gemeinschaft.
- [13] NDA (2010). Scientific Opinion on Dietary Reference Values for carbohydrates and dietary fibre. *EFSA Journal*, 8 (3), 1-77.
- [14] Anonym (2018). HiPP Milchnahrungen im Überblick. Online unter: [www.hipp.de/milchnahrung/produkte/produktstartseite/anfangsnahrungen](http://www.hipp.de/milchnahrung/produkte/produktstartseite/anfangsnahrungen), zugegriffen am 2.10.2018.
- [15] Anonym (2015). Galacto-Oligosaccharides (GOS) Market By Application (Food & Beverage, Dietary Supplements) Is Expected To Reach USD 1.01 Billion By 2020. Online unter: [www.grandviewresearch.com/industry-analysis/galacto-oligosaccharides-gos-market](http://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/galacto-oligosaccharides-gos-market), zugegriffen am 11.3.2015.
- [16] J. Byfield, S. Cardenas, C.J. Alméciga-Díaz & O.F. Sánchez (2010).  $\beta$ -galactosidase and galactooligosaccharides production and applications. *Recent Patents on Chemical Engineering*, 3 (1), 17-29.
- [17] Anonym (2017). Lactose, USA - Average Monthly prices of Lactose. Online unter: [www.clal.it/en/index.php?section=lattosio](http://www.clal.it/en/index.php?section=lattosio), zugegriffen am 24.10.2017.



- [18] R. Das, D. Sen, A. Sarkar, S. Bhattacharyya & C. Bhattacharjee (2011). A comparative study on the production of galacto-oligosaccharide from whey permeate in recycle membrane reactor and in enzymatic batch reactor. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 50 (2), 806-816.
- [19] V.A. Abelyan (1998). Enzymatic production of galactooligosaccharide syrup from milk whey. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 34 (4), 331-334.
- [20] B. Rodriguez-Colinas, L. Fernandez-Arrojo, A.O. Ballesteros & F.J. Plou (2014). Galactooligosaccharides formation during enzymatic hydrolysis of lactose: Towards a prebiotic-enriched milk. *Food Chemistry*, 145, 388-394.
- [21] B.A. Rabiou, A.J. Jay, G.R. Gibson & R.A. Rastall (2001). Synthesis and Fermentation Properties of Novel Galacto-Oligosaccharides by  $\beta$ -Galactosidases from *Bifidobacterium* Species. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (6), 2526-2530.
- [22] P. Jelen (2011). Whey Processing. In: *Encyclopedia of Dairy Sciences second edition*, Hrsg: J.W. Fuquay, P.F. Fox & P.L.H. McSweeney, Elsevier Ltd. 731-743.
- [23] J.A. Lucey (2011). Rennet-Induced Coagulation of Milk. In: *Encyclopedia of Dairy Sciences second edition*, Hrsg: J.W. Fuquay, P.F. Fox & P.L.H. McSweeney, Elsevier Ltd. 579-584.
- [24] G. Bylund (1995). Whey processing. In: *Dairy processing handbook*, Hrsg: TeknотextAB, Lund, Tetra Pak Processing Systems AB. 331-352.
- [25] M.E. Pintado, A.C. Macedo & F.X. Malcata (2001). Review: Technology, Chemistry and Microbiology of Whey Cheeses. *Food Science and Technology International*, 7 (2), 105-116.
- [26] Anonym (2013). 2012 Dairy Products Utilization & Production Trends. Online unter: [https://dairymarkets.org/PubPod/Reference/Library/ADPI\\_2012.pdf](https://dairymarkets.org/PubPod/Reference/Library/ADPI_2012.pdf), zugegriffen am 28.9.2018.
- [27] M. Wohlfarth & K. Pöttsch (2018). Geschäftsbericht 2017/2018, Teil II - Statistischer Anhang. Online unter: [https://milchindustrie.de/wp-content/uploads/2018/09/ZahlenDatenFakten\\_2018.pdf](https://milchindustrie.de/wp-content/uploads/2018/09/ZahlenDatenFakten_2018.pdf), zugegriffen am 1.10.2018.
- [28] Anonym (2018). Our Greek Heritage. Online unter: <https://usa.fage.com/company/our-greek-heritage>, zugegriffen am 2.10.2018.
- [29] G.W. Smithers (2008). Whey and whey proteins-From 'gutter-to-gold'. *International Dairy Journal*, 18 (7), 695-704.
- [30] G. Pesta, R. Meyer-Pittroff & W. Russ (2007). Utilization of Whey. In: *Utilization of By-Products and Treatment of Waste in the Food Industry*, Hrsg: V. Oreopoulou & W. Russ, Springer. 193-208.
- [31] J.A. Lucey (2011). Acid- and Acid/Heat Coagulated Cheese. In: *Encyclopedia of Dairy Sciences second edition*, Hrsg: J.W. Fuquay, P.F. Fox & P.L.H. McSweeney, Elsevier Ltd. 698-705.
- [32] L.I. Bell (2014). Nutritious beverage formed from fluid acid whey and a method of forming a nutritious beverage by combining fluid acid whey and a juice. Patent-Nr.: US 2014/0335226A1.
- [33] G.W. Smithers (2015). Whey-ing up the options - Yesterday, today and tomorrow. *International Dairy Journal*, 48, 2-14.
- [34] OECD/FAO (2017). Table 3.A1.5. World dairy projections: Butter and cheese, In: *OECD-FAO Agricultural Outlook 2017-2026*. OECD/FAO.
- [35] Anonym (2018). OECD-FAO Agricultural Outlook, OECD Agriculture statistics (database). Online unter: <http://dx.doi.org/10.1787/agr-outl-data-en>, zugegriffen am 1.10.2018.
- [36] T. Affertsholt (2009). International Whey Market Overview. *ADPI/ABI Annual Conference*. Chicago, 25.-27.4.2009.
- [37] Anonym (2018). Economic Report 2017/18. Online unter: [http://ewpa.euromilk.org/fileadmin/user\\_upload/Public\\_Documents/EWPA/Economic\\_Report\\_2017\\_web\\_final\\_publishing-9-12.pdf](http://ewpa.euromilk.org/fileadmin/user_upload/Public_Documents/EWPA/Economic_Report_2017_web_final_publishing-9-12.pdf), zugegriffen am 28.9.2018.

- [38] Anonym (2018). Market share of Greek yogurt worldwide in 2016, by region. Online unter: [www.statista.com/statistics/296055/global-greek-yogurt-market-share](http://www.statista.com/statistics/296055/global-greek-yogurt-market-share), zugegriffen am 2.10.2018.
- [39] G. Uduwerella, J. Chandrapala & T. Vasiljevic (2017). Minimising generation of acid whey during Greek yoghurt manufacturing. *Journal of Dairy Research*, 84 (3), 346-354.
- [40] A. Córdova, C. Astudillo, C. Vera, C. Guerrero & A. Illanes (2016). Performance of an ultrafiltration membrane bioreactor (UF-MBR) as a processing strategy for the synthesis of galacto-oligosaccharides at high substrate concentrations. *Journal of Biotechnology*, 223, 26-35.
- [41] Anonym (2018). Verordnung über Anforderungen an das Einleiten von Abwasser in Gewässer (Abwasserverordnung - AbwV). Bundesministeriums der Justiz und für Verbraucherschutz.
- [42] T. Affertsholt (2007). Market developments and industry challenges for lactose and lactose derivatives. *IDF Symposium Lactose and Its Derivatives*. Moscow, 14.-16.5.2007.
- [43] Anonym (2006). Whey in animal nutrition - A valuable ingredient. Online unter: [http://ewpa.euromilk.org/fileadmin/user\\_upload/Public\\_Documents/EWPA\\_Publications/Whey\\_in\\_Animal\\_Nutrition\\_-\\_A\\_Valuable\\_Ingredient\\_\\_EWPA\\_B.pdf](http://ewpa.euromilk.org/fileadmin/user_upload/Public_Documents/EWPA_Publications/Whey_in_Animal_Nutrition_-_A_Valuable_Ingredient__EWPA_B.pdf), zugegriffen am 28.9.2018.
- [44] J.B. Królczyk, T. Dawidziuk, E. Janiszewska-Turak & B. Sołowiej (2016). Use of Whey and Whey Preparations in the Food Industry - A Review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 66 (3), 157-165.
- [45] I. Jeličić, R. Božanić & L. Tratnik (2008). Whey based beverages - New generation of dairy products. *Mljekarstvo*, 58 (3), 257-274.
- [46] F.V. Kosikowski (1968). Nutritional Beverages from Acid Whey Powder. *Journal of Dairy Science*, 51 (8), 1299-1301.
- [47] C. Andersen, T. Jensen & L. Bøjlesen (2010). A drinkable acidified dairy product based on acid whey and a process of preparing it. Patent-Nr.: EP2451292B1.
- [48] Y. Wang (2011). Method for preparing whey beer Patent-Nr.: CN102181331B.
- [49] M. Hayes (2018). Alcohol from dairy waste may be headed to tap near you. Online unter: <http://news.cornell.edu/stories/2018/04/alcohol-dairy-waste-may-be-headed-tap-near-you>, zugegriffen am 28.9.2018.
- [50] Anonym (2018). Black Cow - World's Smoothest Vodka. Online unter: [www.blackcow.co.uk](http://www.blackcow.co.uk), zugegriffen am 28.9.2018.
- [51] A.W. Schepers, J. Thibault & C. Lacroix (2002). *Lactobacillus helveticus* growth and lactic acid production during pH-controlled batch cultures in whey permeate/yeast extract medium. Part I. Multiple factor kinetic analysis. *Enzyme and Microbial Technology*, 30 (2), 176-186.
- [52] P.S. Panesar, J.F. Kennedy, D.N. Gandhi & K. Bunko (2007). Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food Chemistry*, 105 (1), 1-14.
- [53] C. Tari, F.I. Ustok & S. Harsa (2010). Production of food grade  $\beta$ -galactosidase from artisanal yogurt strains. *Food Biotechnology*, 24 (1), 78-94.
- [54] N.P. Laxmi, M.A. Mutamed & P.S. Nagendra (2011). Effect of nitrogen sources on production of  $\beta$ -galactosidase from *Bifidobacterium animalis* Bb12 and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ATCC 11842 grown in whey under different culture conditions. *International Food Research Journal*, 18 (1), 445-450.
- [55] L.N. Prasad, B.C. Ghosh, F. Sherkat & N.P. Shah (2013). Extraction and characterisation of  $\beta$ -galactosidase produced by *Bifidobacterium animalis* spp. *lactis* Bb12 and *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* ATCC 11842 grown in whey. *International Food Research Journal*, 20 (1), 487-494.
- [56] H.A. Murad, R.I. Refaea & E.M. Aly (2011). Utilization of UF-permeate for production of  $\beta$ -galactosidase by lactic acid bacteria. *Polish Journal of Microbiology*, 60 (2), 139-144.

- 
- [57] A. Jokar & A. Karbassi (2009). Determination of proper conditions for the production of crude beta-galactosidase using *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 11 (3), 301-308.
  - [58] S. Alonso, M. Rendueles & M. Díaz (2011). Efficient lactobionic acid production from whey by *Pseudomonas taetrolens* under pH-shift conditions. *Bioresource Technology*, 102 (20), 9730-9736.
  - [59] S. Hanoune, B. Djeghri-Hocine, Z. Kassas, Z. Derradji, A. Boudour & M. Boukhemis (2015). Optimization of *Lactobacillus fermentum* DSM 20049 growth on whey and lupin based medium using response surface methodology. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 9 (9), 679-685.
  - [60] B. Demirel, O. Yenigun & T.T. Onay (2005). Anaerobic treatment of dairy wastewaters: A review. *Process Biochemistry*, 40 (8), 2583-2595.
  - [61] L. Grosu, B. Fernandez, C.G. Grigoraş, O.I. Patriciu, I.C. Grig, D. Nicuţă, D. Ciobanu, L. Gavrilă & A.L. Fînar (2012). Valorization of whey from dairy industry for agricultural use as fertiliser: Effects on plant germination and growth. *Environmental Engineering and Management Journal*, 11 (12), 2203-2210.
  - [62] A. Moll (1989). Verwendung von Molke als Dünger. Patent-Nr.: DE3826390C1.
  - [63] S. Placzek, I. Schomburg, A. Chang, L. Jeske, M. Ulbrich, J. Tillack & D. Schomburg (2017). BRENDA in 2017: New perspectives and new tools in BRENDA. *Nucleic Acids Research*, 45 (D1), D380-D388.
  - [64] Institute of Medicine (2003). Food Chemicals Codex: Fifth Edition. Washington, DC, The National Academies Press. 998.
  - [65] K. Ohtsuka, A. Tanoh, O. Ozawa, T. Kanematsu, T. Uchida & R. Shinke (1990). Purification and properties of a  $\beta$ -galactosidase with high galactosyl transfer activity from *Cryptococcus laurentii* OKN-4. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 70 (5), 301-307.
  - [66] T.H. Nguyen, B. Splechtna, M. Steinböck, W. Kneifel, H.P. Lettner, K.D. Kulbe & D. Haltrich (2006). Purification and characterization of two novel  $\beta$ -galactosidases from *Lactobacillus reuteri*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (14), 4989-4998.
  - [67] S. O'Connell & G. Walsh (2010). A novel acid-stable, acid-active  $\beta$ -galactosidase potentially suited to the alleviation of lactose intolerance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86 (2), 517-524.
  - [68] T.H. Nguyen, B. Splechtna, S. Krasteva, W. Kneifel, K.D. Kulbe, C. Divne & D. Haltrich (2007). Characterization and molecular cloning of a heterodimeric  $\beta$ -galactosidase from the probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* R22. *FEMS Microbiology Letters*, 269 (1), 136-144.
  - [69] S. Iqbal, T.H. Nguyen, H.A. Nguyen, T.T. Nguyen, T. Maischberger, R. Kittl & D. Haltrich (2011). Characterization of a heterodimeric GH2  $\beta$ -galactosidase from *Lactobacillus sakei* Lb790 and formation of prebiotic galacto-oligosaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59 (8), 3803-3811.
  - [70] S. Iqbal, T.H. Nguyen, T.T. Nguyen, T. Maischberger & D. Haltrich (2010).  $\beta$ -galactosidase from *Lactobacillus plantarum* WCFS1: Biochemical characterization and formation of prebiotic galacto-oligosaccharides. *Carbohydrate Research*, 345 (10), 1408-1416.
  - [71] T. Maischberger, E. Leitner, S. Nitisinprasert, O. Juajun, M. Yamabhai, T.H. Nguyen & D. Haltrich (2010).  $\beta$ -galactosidase from *Lactobacillus pentosus*: Purification, characterization and formation of galacto-oligosaccharides. *Biotechnology Journal*, 5 (8), 838-847.
  - [72] T.T. Nguyen, H.A. Nguyen, S.L. Arreola, G. Mlynek, K. Djinović-Carugo, G. Mathiesen, T.H. Nguyen & D. Haltrich (2012). Homodimeric  $\beta$ -Galactosidase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DSM 20081: Expression in *Lactobacillus plantarum* and Biochemical Characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60 (7), 1713-1721.

- [73] B.W. Matthews (2005). The structure of *E. coli*  $\beta$ -galactosidase. *Comptes Rendus - Biologies*, 328 (6 SPEC. ISS.), 549-556.
- [74] T. Nakagawa, Y. Fujimoto, R. Ikehata, T. Miyaji & N. Tomizuka (2006). Purification and molecular characterization of cold-active  $\beta$ -galactosidase from *Arthrobacter psychrolactophilus* strain F2. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72 (4), 720-725.
- [75] Y. Li, T. Yao, M. Wei, M. Yan, N. Hao & L. Xu (2010). Study on the characterization of a potential thermostable  $\beta$ -galactosidase from *Thermus thermophilus* HB27. *3rd International Conference on Biomedical Engineering and Informatics, BMEI 2010*. Yantai, 16.-18.10.2010.
- [76] J.L. Berger, B.H. Lee & C. Lacroix (1995). Immobilization of  $\beta$ -galactosidases from *Thermus aquaticus* YT-1 for oligosaccharides synthesis. *Biotechnology Techniques*, 9 (8), 601-606.
- [77] C.S. Kim, E.S. Ji & D.K. Oh (2004). Characterization of a thermostable recombinant  $\beta$ -galactosidase from *Thermotoga maritima*. *Journal of Applied Microbiology*, 97 (5), 1006-1014.
- [78] Y. Tanaka, A. Kagamiishi, A. Kiuchi & T. Horiuchi (1975). Purification and properties of  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Journal of Biochemistry*, 77 (1), 241-247.
- [79] N. Onishi & T. Tanaka (1997). Purification and characterization of galacto-oligosaccharide-producing  $\beta$ -galactosidase from *Sirobasidium magnum*. *Letters in Applied Microbiology*, 24 (2), 82-86.
- [80] R. Cruz, V. D'Arcadia Cruz, J.G. Belote, M. De Oliveira Khenayfes, C. Dorta, L.H. Dos Santos Oliveira, E. Ardiles & A. Galli (1999). Production of transgalactosylated oligosaccharides (TOS) by galactosyltransferase activity from *Penicillium simplicissimum*. *Bioresource Technology*, 70 (2), 165-171.
- [81] S.L. Arreola, M. Intanon, J. Suljic, R. Kittl, N.H. Pham, P. Kosma, D. Haltrich & T.H. Nguyen (2014). Two  $\beta$ -galactosidases from the human isolate *Bifidobacterium breve* DSM 20213: Molecular cloning and expression, biochemical characterization and synthesis of galacto-oligosaccharides. *PLoS ONE*, 9 (8), 1-13.
- [82] N. Hassan, T.H. Nguyen, M. Intanon, L.D. Kori, B.K.C. Patel, D. Haltrich, C. Divne & T.C. Tan (2014). Biochemical and structural characterization of a thermostable  $\beta$ -glucosidase from *Halothermothrix orenii* for galacto-oligosaccharide synthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99 (4), 1731-1744.
- [83] M.N. Hung & B. Lee (2002). Purification and characterization of a recombinant  $\beta$ -galactosidase with transgalactosylation activity from *Bifidobacterium infantis* HL96. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58 (4), 439-445.
- [84] P. Nakkharat & D. Haltrich (2006). Lactose hydrolysis and formation of galactooligosaccharides by a novel immobilized  $\beta$ -galactosidase from the thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 129 (1-3), 215-225.
- [85] O. Juajun, T.H. Nguyen, T. Maischberger, S. Iqbal, D. Haltrich & M. Yamabhai (2011). Cloning, purification, and characterization of  $\beta$ -galactosidase from *Bacillus licheniformis* DSM 13. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89 (3), 645-654.
- [86] J.W. Kim & S.N. Rajagopal (2000). Isolation and characterization of  $\beta$ -galactosidase from *Lactobacillus crispatus*. *Folia Microbiologica*, 45, 29-34.
- [87] J. Jakubowski, J.R. Giacini, D.H. Kleyn, S.G. Gilbert & J.G. Leeder (1975). Effect of calcium, magnesium and whey proteins on the activity of  $\beta$ -galactosidase (*A. niger*) immobilized on collagen. *Journal of Food Science*, 40 (3), 467-469.
- [88] J. Smart & B. Richardson (1987). Molecular properties and sensitivity to cations of  $\beta$ -Galactosidase from *Streptococcus thermophilus* with four enzyme substrates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 26 (2), 177-185.
- [89] J. Garman, T. Coolbear & J. Smart (1996). The effect of cations on the hydrolysis of lactose and the transferase reactions catalysed by  $\beta$ -galactosidase from six strains of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 46 (1), 22-27.

- [90] M.V. Flores, R.J. Ertola & C.E. Voget (1996). Effect of monovalent cations on the stability and activity of *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galactosidase. *LWT - Food Science and Technology*, 29 (5-6), 503-506.
- [91] B.S. Chang & R.R. Mahoney (1989). Factors affecting the thermostability of  $\beta$ -galactosidase (*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*) in milk: a quantitative study. *Journal of Dairy Research*, 56 (5), 785-792.
- [92] N.A. Greenberg & R.R. Mahoney (1984). The activity of lactase (*Streptococcus thermophilus*) in milk and sweet whey. *Food Chemistry*, 15 (4), 307-313.
- [93] M.W. Griffiths & D.D. Muir (1978). Properties of a Thermostable  $\beta$ -Galactosidase from a Thermophilic *Bacillus*: Comparison of the Enzyme Activity of Whole Cells, Purified Enzyme and Immobilised Whole Cells. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 29 (9), 753-761.
- [94] H. Sheth, P. Jelen & N. Shah (1988). Lactose Hydrolysis in Ultrafiltration-Treated Cottage Cheese Whey with Various Whey Protein Concentrations. *Journal of Food Science*, 53 (3), 746-748.
- [95] S.H. Kim, K.P. Lim & H.S. Kim (1997). Differences in the Hydrolysis of Lactose and Other Substrates by  $\beta$ -D-Galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Journal of Dairy Science*, 80 (10), 2264-2269.
- [96] B. Splechtna, T.H. Nguyen, R. Zehetner, H.P. Lettner, W. Lorenz & D. Haltrich (2007). Process development for the production of prebiotic galacto-oligosaccharides from lactose using  $\beta$ -galactosidase from *Lactobacillus* sp. *Biotechnology Journal*, 2 (4), 480-485.
- [97] M.W. Griffiths & D.D. Muir (1980). Hydrolysis of lactose by a thermostable  $\beta$ -galactosidase immobilised on DEAE-cellulose. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 31 (4), 397-404.
- [98] C. Mateo, R. Monti, B.C.C. Pessela, M. Fuentes, R. Torres, J.M. Guisán & R. Fernández-Lafuente (2004). Immobilization of lactase from *Kluyveromyces lactis* greatly reduces the inhibition promoted by glucose. Full hydrolysis of lactose in milk. *Biotechnology Progress*, 20 (4), 1259-1262.
- [99] A.R. Park & D.K. Oh (2010). Galacto-oligosaccharide production using microbial  $\beta$ -galactosidase: Current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85 (5), 1279-1286.
- [100] E. Demirhan, D.K. Apar & B. Özbek (2008). Product inhibition of whey lactose hydrolysis. *Chemical Engineering Communications*, 195 (3), 293-304.
- [101] A. Mause (2016). Enzymatische Herstellung von Galactooligosacchariden aus Molke. Dissertation, Ruhr-Universität Bochum. Online unter: <https://hss-opus.ub.ruhr-uni-bochum.de/opus4/frontdoor/index/index/docId/5158>.
- [102] C.S. Kim, E.S. Ji & D.K. Oh (2004). A new kinetic model of recombinant  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* for both hydrolysis and transgalactosylation reactions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 316 (3), 738-743.
- [103] A. Warmerdam, J. Wang, R.M. Boom & A.E.M. Janssen (2013). Effects of carbohydrates on the oNPG converting activity of  $\beta$ -galactosidases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61 (26), 6458-6464.
- [104] N. Onishi, I. Kira & K. Yokozeki (1996). Galacto-oligosaccharide production from lactose by *Sirobasidium magnum* CBS6803. *Letters in Applied Microbiology*, 23 (4), 253-256.
- [105] Anonym (2017). NOLA™Fit5500 Product Information. Online unter: [https://hjemmeriet.com/se/ChrHansen/Products/NOLA-Fit/PI\\_GLOB\\_NOLA\\_Fit5500\\_350502\\_EN.pdf](https://hjemmeriet.com/se/ChrHansen/Products/NOLA-Fit/PI_GLOB_NOLA_Fit5500_350502_EN.pdf), zugegriffen am 21.8.2018.
- [106] Anonym (2018). Datenblatt Lactazyme A Lactase. Online unter: [https://docs.wixstatic.com/ugd/0e2bdb\\_8d69da24bae54ff2940c2bcb81bf12df.pdf](https://docs.wixstatic.com/ugd/0e2bdb_8d69da24bae54ff2940c2bcb81bf12df.pdf), zugegriffen am 14.8.2018.

- [107] Anonym (2015). Produktdatenblatt Biolactase F Conc. Online unter: [http://biocon.es/wp-content/uploads/2015/06/2910-Biolactase-F-conc\\_EN.pdf](http://biocon.es/wp-content/uploads/2015/06/2910-Biolactase-F-conc_EN.pdf), zugegriffen am 16.6.2017.
- [108] Anonym (2013). Dairyzym F 50 P - Produktdatenblatt Version 30.01.13. SternEnzym GmbH & Co.KG.
- [109] Anonym (2013). Maxilact® Application Data Sheet - Application: acid whey. DSM Food Specialties B.V.
- [110] Anonym (2013). opti-lactase P (Pulverlactase) Datenblatt. Optiferm GmbH.
- [111] Anonym (2018). Datenblatt Lactazyme B Lactase. Online unter: [https://docs.wixstatic.com/ugd/0e2bdb\\_cd80a658f49649f389e920177fb2e8a3.pdf](https://docs.wixstatic.com/ugd/0e2bdb_cd80a658f49649f389e920177fb2e8a3.pdf), zugegriffen am 14.8.2018.
- [112] C. Sherwin (2018). Clean-label sweetness with Saphera® FMP. *Clean Label Conference*. Itasca, 26.-28.3.2018.
- [113] Anonym (2015). Produktdatenblatt BIOLACTASE NL. Online unter: <http://biocon.es/wp-content/uploads/2015/09/2510-Biolactasa-NL-eng.pdf>, zugegriffen am 16.6.2017.
- [114] Anonym (2018). Dairyzym Y 50 L Produktdatenblatt. Online unter: <https://sternenzym.de/downloads/sternenzym-dairyzym-de.pdf>, zugegriffen am 21.8.2018.
- [115] Anonym (2014). Ha-Lactase 5200 Product Information. Online unter: [https://hjemmeriet.com/no/uploads/dokumenter/PI\\_GLOB\\_Ha-Lactase5200\\_450804\\_EN.pdf](https://hjemmeriet.com/no/uploads/dokumenter/PI_GLOB_Ha-Lactase5200_450804_EN.pdf), zugegriffen am 25.5.2018.
- [116] Anonym (2013). Maxilact® Application Data Sheet - Application: pasteurized, ESL or UHT Milk in batch processes. DSM Food Specialties B.V.
- [117] Anonym (2011). Lactozym® Pure 6500 L Produktdatenblatt. Novozymes A/S.
- [118] Anonym (2013). opti-lactase LX2 Datenblatt. Optiferm GmbH.
- [119] Anonym (2018). Maxilact® Smart, the lactase with an impact on efficiency. Online unter: [www.dsm.com/markets/foodandbeverages/en\\_US/products/enzymes/fresh-dairy/maxilact-smart.html](http://www.dsm.com/markets/foodandbeverages/en_US/products/enzymes/fresh-dairy/maxilact-smart.html), zugegriffen am 21.8.2018.
- [120] H.V. Henriksen, S. Ernst, R. Wilting, J.W. Tams, M.O. Runge & H.S. Guldager (2016). Method for producing a low-lactose dairy product. Patent-Nr.: EP2234501B1.
- [121] F. Jörgensen, O.C. Hansen & P. Stougaard (2001). Isolierte beta-Galactosidase von Bifidobacterium. Patent-Nr.: EP1283876B1.
- [122] G. Tzortzis & J. Vulevic (2009). Galacto-Oligosaccharide Prebiotics. In: *Prebiotics and Probiotics Science and Technology*, Hrsg: D. Charalampopoulos & R.A. Rastall, New York, Springer Science + Business Media, LLC. 207-244.
- [123] N.G. Asp, A. Burvall, A. Dahlqvist, P. Hallgren & A. Lundblad (1980). Oligosaccharide formation during hydrolysis of lactose with *Saccharomyces lactis* lactase (Maxilact®): Part 2- Oligosaccharide structures. *Food Chemistry*, 5 (2), 147-153.
- [124] R.R. Mahoney (1998). Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: A review. *Food Chemistry*, 63 (2), 147-154.
- [125] R.E. Huber, G. Kurz & K. Wallenfels (1976). A Quantitation of the Factors Which Affect the Hydrolase and Transgalactosylase Activities of  $\beta$ -Galactosidase (*E. coli*) on Lactose. *Biochemistry*, 15 (9), 1994-2001.
- [126] H. Yin, J.B. Bultema, L. Dijkhuizen & S.S. van Leeuwen (2017). Reaction kinetics and galactooligosaccharide product profiles of the  $\beta$ -galactosidases from *Bacillus circulans*, *Kluyveromyces lactis* and *Aspergillus oryzae*. *Food Chemistry*, 225, 230-238.
- [127] D.P. Torres, M. Gonçalves, J.A. Teixeira & L.R. Rodrigues (2010). Galacto-Oligosaccharides: Production, properties, applications, and significance as prebiotics. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9 (5), 438-454.
- [128] A. Gosling, G.W. Stevens, A.R. Barber, S.E. Kentish & S.L. Gras (2010). Recent advances refining galactooligosaccharide production from lactose. *Food Chemistry*, 121 (2), 307-318.

- [129] B. Splechtna, T.H. Nguyen & D. Haltrich (2007). Comparison between discontinuous and continuous lactose conversion processes for the production of prebiotic galacto-oligosaccharides using  $\beta$ -galactosidase from *Lactobacillus reuteri*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (16), 6772-6777.
- [130] M. Frenzel, K. Zerge, I. Clawin-Rädecker & P.C. Lorenzen (2015). Comparison of the galacto-oligosaccharide forming activity of different  $\beta$ -galactosidases. *LWT - Food Science and Technology*, 60 (2), 1068-1071.
- [131] D.F.M. Neri, V.M. Balcão, F.O.Q. Dourado, J.M.B. Oliveira, L.B. Carvalho Jr & J.A. Teixeira (2011). Immobilized  $\beta$ -galactosidase onto magnetic particles coated with polyaniline: Support characterization and galactooligosaccharides production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 70 (1-2), 74-80.
- [132] N. Albayrak & S.T. Yang (2002). Production of galacto-oligosaccharides from lactose by *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase immobilized on cotton cloth. *Biotechnology and Bioengineering*, 77 (1), 8-19.
- [133] A. Goulas, G. Tzortzis & G.R. Gibson (2007). Development of a process for the production and purification of  $\alpha$ - and  $\beta$ -galactooligosaccharides from *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171. *International Dairy Journal*, 17 (6), 648-656.
- [134] T. Vasiljevic & P. Jelen (2003). Oligosaccharide production and proteolysis during lactose hydrolysis using crude cellular extracts from lactic acid bacteria. *Lait*, 83 (6), 453-467.
- [135] C.V. Yañez-Neco, B. Rodriguez-Colinas, L. Amaya-Delgado, A.O. Ballesteros, A. Gschaedler, F.J. Plou & J. Arrizon (2017). Galactooligosaccharide production from *Pantoea anthophila* strains isolated from "Tejuino", a mexican traditional fermented beverage. *Catalysts*, 7 (8), 1-11.
- [136] N. Onishi, A. Yamashiro & K. Yokozeki (1995). Production of galacto-oligosaccharide from lactose by *Sterigmatomyces elviae* CBS8119. *Applied and Environmental Microbiology*, 61 (11), 4022-4025.
- [137] J.L. Berger, B.H. Lee & C. Lacroix (1995). Oligosaccharides synthesis by free and immobilized  $\beta$ -galactosidases from *Thermus aquaticus* YT-1. *Biotechnology Letters*, 17 (10), 1077-1080.
- [138] A. Osman, G. Tzortzis, R.A. Rastall & D. Charalampopoulos (2012). BbgIV is an important *Bifidobacterium*  $\beta$ -galactosidase for the synthesis of prebiotic galactooligosaccharides at high temperatures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60 (3), 740-748.
- [139] B. Rodriguez-Colinas, M.A. De Abreu, L. Fernandez-Arrojo, et al. (2011). Production of galacto-oligosaccharides by the  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*: Comparative analysis of permeabilized cells versus soluble enzyme. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59 (19), 10477-10484.
- [140] N. Onishi & T. Tanaka (1995). Purification and properties of a novel thermostable galacto-oligosaccharide-producing  $\beta$ -galactosidase from *Sterigmatomyces elviae* CBS8119. *Applied and Environmental Microbiology*, 61 (11), 4026-4030.
- [141] N. Onishi & T. Tanaka (1996). Purification and Properties of a Galacto- and Gluco-Oligosaccharide-Producing  $\beta$ -Glycosidase from *Rhodotorula minuta* IFO879. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 82 (5), 439-443.
- [142] N. Onishi & K. Yokozeki (1996). Gluco-oligosaccharide and galacto-oligosaccharide production by *Rhodotorula minuta* IFO879. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 82 (2), 124-127.
- [143] C.R. Lisboa, L. de Simoni Martinez, R.A. Trindade, F.A. de Almeida Costa, J.F. de Medeiros Burkert & C.A.V. Burkert (2012). Response surface methodology applied to the enzymatic synthesis of galacto-oligosaccharides from cheese whey. *Food Science and Biotechnology*, 21 (6), 1519-1524.
- [144] D. Roy, L. Daoudi & A. Azaola (2002). Optimization of galacto-oligosaccharide production by *Bifidobacterium infantis* RW-8120 using response surface methodology. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 29 (5), 281-285.

- [145] T. Palai & P.K. Bhattacharya (2013). Kinetics of lactose conversion to galacto-oligosaccharides by  $\beta$ -galactosidase immobilized on PVDF membrane. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 115 (6), 668-673.
- [146] D.F.M. Neri, V.M. Balcão, R.S. Costa, I.C.A.P. Rocha, E.M.F.C. Ferreira, D.P.M. Torres, L.R.M. Rodrigues, L.B. Carvalho Jr & J.A. Teixeira (2009). Galacto-oligosaccharides production during lactose hydrolysis by free *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase and immobilized on magnetic polysiloxane-polyvinyl alcohol. *Food Chemistry*, 115 (1), 92-99.
- [147] J.I.S. Valero (2009). Production of galacto-oligosaccharides from lactose by immobilized  $\beta$ -galactosidase and posterior chromatographic separation. Dissertation, The Ohio State University. Online unter: [https://etd.ohiolink.edu/!etd.send\\_file?accession=osu1230909589&disposition=inline](https://etd.ohiolink.edu/!etd.send_file?accession=osu1230909589&disposition=inline).
- [148] C. Martínez-Villaluenga, A. Cardelle-Cobas, N. Corzo, A. Olano & M. Villamiel (2008). Optimization of conditions for galactooligosaccharide synthesis during lactose hydrolysis by  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* (Lactozym 3000 L HP G). *Food Chemistry*, 107 (1), 258-264.
- [149] E.S. Ji, N.H. Park & D.K. Oh (2005). Galacto-oligosaccharide production by a thermostable recombinant  $\beta$ -galactosidase from *Thermotoga maritima*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21 (5), 759-764.
- [150] P.F. Fox & P.L.H. McSweeney (1998). Lactose. In: *Dairy Chemistry and Biochemistry*, Hrsg: N.N., Thomson Science. 21-66.
- [151] K. Zerge (2014). Charakterisierung und Gewinnung von Oligosacchariden als potentiell funktionelle Lebensmittelinhaltsstoffe. Dissertation, Technische Universität Dresden. Online unter: [http://tud.qucosa.de/fileadmin/data/qucosa/documents/15712/Dissertation\\_Zerge\\_2014\\_pdfa.pdf](http://tud.qucosa.de/fileadmin/data/qucosa/documents/15712/Dissertation_Zerge_2014_pdfa.pdf).
- [152] I. González-Delgado, M.J. López-Muñoz, G. Morales & Y. Segura (2016). Optimisation of the synthesis of high galacto-oligosaccharides (GOS) from lactose with  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *International Dairy Journal*, 61, 211-219.
- [153] I.F. Gorlov, A.G. Khramtsov, I.A. Evdokimov, A.D. Lodygin, A.B. Rodnaya, M.I. Slozhenkina, N.I. Mosolova, E.Y. Zlobina & E.V. Karpenko (2015). New approach for lactose transglycosylation into galactooligosaccharides. *Pakistan Journal of Nutrition*, 14 (11), 822-827.
- [154] A. Srivastava, S. Mishra & S. Chand (2015). Transgalactosylation of lactose for synthesis of galacto-oligosaccharides using *Kluyveromyces marxianus* NCIM 3551. *New Biotechnology*, 32 (4), 412-418.
- [155] M. Carević, M. Vukašinović-Sekulić, M. Ćorović, H. Rogniaux, D. Ropartz, D. Veličković & D. Bezbradica (2018). Evaluation of  $\beta$ -galactosidase from *Lactobacillus acidophilus* as biocatalyst for galacto-oligosaccharides synthesis: Product structural characterization and enzyme immobilization. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 126 (6), 697-704.
- [156] E.Z. Goma (2018).  $\beta$ -galactosidase from *Lactobacillus delbrueckii* and *Lactobacillus reuteri*: Optimization, characterization and formation of galactooligosaccharides. *Indian Journal of Biotechnology*, 17 (3), 407-415.
- [157] Z. Li, M. Xiao, L. Lu & Y. Li (2008). Production of non-monosaccharide and high-purity galactooligosaccharides by immobilized enzyme catalysis and fermentation with immobilized yeast cells. *Process Biochemistry*, 43 (8), 896-899.
- [158] A. Gosling, J. Alfrén, G.W. Stevens, A.R. Barber, S.E. Kentish & S.L. Gras (2009). Facile pretreatment of *Bacillus circulans*  $\beta$ -galactosidase increases the yield of galactosyl oligosaccharides in milk and lactose reaction systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (24), 11570-11574.



- [159] A.P. Bakken, C.G. Hill Jr & C.H. Amundson (1992). Hydrolysis of lactose in skim milk by immobilized  $\beta$ -galactosidase (*Bacillus circulans*). *Biotechnology and Bioengineering*, 39 (4), 408-417.
- [160] S.T. Yang & I.C. Tang (1988). Lactose Hydrolysis and Oligosaccharide Formation Catalyzed by  $\beta$ -Galactosidase Kinetics and Mathematical Modeling. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 542 (1), 417-422.
- [161] P. Sen, A. Nath, C. Bhattacharjee, R. Chowdhury & P. Bhattacharya (2014). Process engineering studies of free and micro-encapsulated  $\beta$ -galactosidase in batch and packed bed bioreactors for production of galactooligosaccharides. *Biochemical Engineering Journal*, 90, 59-72.
- [162] M.A. Boon, A.E.M. Janssen & K. Van 't Riet (2000). Effect of temperature and enzyme origin on the enzymatic synthesis of oligosaccharides. *Enzyme and Microbial Technology*, 26 (2-4), 271-281.
- [163] T. Palai, A. Kumar & P.K. Bhattacharya (2015). Kinetic studies and model development for the formation of galacto-oligosaccharides from lactose using synthesized thermo-responsive bioconjugate. *Enzyme and Microbial Technology*, 70, 42-49.
- [164] J.H. Kim, D.H. Lee & J.S. Lee (2001). Production of galactooligosaccharide by  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces maxianus* var *lactis* OE-20. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 6 (5), 337-340.
- [165] T.S. Song, K.S. Lee, S.B. Kang, S.H. Yoo, J.I. Lee & S.S. Yoon (2013). Synthesis of galactooligosaccharides in the cheese whey-based medium by a lactase from *Lactobacillus paracasei* YSM0308. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 33 (5), 565-571.
- [166] F. Manucci (2009). Enzymatic synthesis of Galactooligosaccharides from whey permeate. M.Phil Arbeit, Dublin Institute of Technology. Online unter: <http://arrow.dit.ie/tourmas/22>.
- [167] S. Pruksasri & K. Supee (2013). Sensory evaluations and stability determinations of goat milk containing galactooligosaccharides. *International Journal of Food Science and Technology*, 48 (12), 2456-2462.
- [168] C. Vera, C. Guerrero, R. Conejeros & A. Illanes (2012). Synthesis of galacto-oligosaccharides by  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae* using partially dissolved and supersaturated solution of lactose. *Enzyme and Microbial Technology*, 50 (3), 188-194.
- [169] M. Foda, S.M. Kholif & A.M. Kholif (2009). Evaluation of goat milk containing galactooligosaccharides after supplementing the ration with amino acids. *International Journal of Dairy Science*, 4 (1), 27-33.
- [170] K. Hellerová & L. Čurda (2009). Influence of type of substrate and enzyme concentration on formation of galacto-oligosaccharides. *Czech Journal of Food Sciences*, 27 (SPEC. ISS.), S372-S374.
- [171] L. Čurda, J. Rudolfová, J. Štětina & B. Dryák (2006). Dried buttermilk containing galactooligosaccharides-process layout and its verification. *Journal of Food Engineering*, 77 (3), 468-471.
- [172] I.Y.S. Rustom, M.I. Foda & M.H. López-Leiva (1998). Formation of oligosaccharides from whey UF-permeate by enzymatic hydrolysis - Analysis of factors. *Food Chemistry*, 62 (2), 141-147.
- [173] B. Rodriguez-Colinas, A. Poveda, J. Jimenez-Barbero, A.O. Ballesteros & F.J. Plou (2012). Galacto-oligosaccharide synthesis from lactose solution or skim milk using the  $\beta$ -galactosidase from *Bacillus circulans*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60 (25), 6391-6398.
- [174] A. Montilla, N. Corzo & A. Olano (2012). Effects of monovalent cations ( $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$ ) on galacto-oligosaccharides production during lactose hydrolysis by *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galactosidase. *Milchwissenschaft*, 67 (1), 14-18.
- [175] S. Chockchaisawasdee, V.I. Athanasopoulos, K. Niranjana & R.A. Rastall (2005). Synthesis of galacto-oligosaccharide from lactose using  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*: Studies on batch and continuous UF membrane-fitted bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 89 (4), 434-443.

- [176] C.R. Lisboa, F.A. de Almeida Costa, J.F. de Medeiros Burkert & C.A.V. Burkert (2012). Synthesis of galactooligosaccharides from lactose using commercial  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Brazilian Journal of Food Technology*, 15 (1), 30-40.
- [177] Y.J. Cho, H.J. Shin & C. Bucke (2003). Purification and biochemical properties of a galactooligosaccharide producing  $\beta$ -galactosidase from *Bullera singularis*. *Biotechnology Letters*, 25 (24), 2107-2111.
- [178] B. Rodriguez-Colinas, L. Fernandez-Arrojo, P. Santos-Moriano, A.O. Ballesteros & F.J. Plou (2016). Continuous packed bed reactor with immobilized  $\beta$ -Galactosidase for production of galactooligosaccharides (GOS). *Catalysts*, 6 (12), 1-12.
- [179] L.E. Wierzbicki & F.V. Kosikowski (1973). Formation of oligosaccharides during  $\beta$ -galactosidase action on lactose. *Journal of Dairy Science*, 56 (11), 1400-1404.
- [180] R. Jovanovic-Malinovska, P. Fernandes, E. Winkelhausen & L. Fonseca (2012). Galacto-oligosaccharides synthesis from lactose and whey by  $\beta$ -galactosidase immobilized in PVA. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 168 (5), 1197-1211.
- [181] M. Xiao, L. Lu & Z. Li (2010). Method for preparing low-lactose whey powder containing galactooligosaccharide. Patent-Nr.: CN101103743 (B).
- [182] B. Splechtna, T.H. Nguyen, M. Steinböck, K.D. Kulbe, W. Lorenz & D. Haltrich (2006). Production of prebiotic galacto-oligosaccharides from lactose using  $\beta$ -galactosidases from *Lactobacillus reuteri*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (14), 4999-5006.
- [183] H. Zhang, W. Li, X. Rui, X. Sun & M. Dong (2013). *Lactobacillus plantarum* 70810 from Chinese paocai as a potential source of  $\beta$ -galactosidase for prebiotic galactooligosaccharides synthesis. *European Food Research and Technology*, 236 (5), 817-826.
- [184] O. Ozawa, K. Ohtsuka, T. Uchida & S. Usami (1991). 4'-Galactosyllactose production in a jar fermentor by *Cryptococcus laurentii* OKN-4. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 72 (4), 309-310.
- [185] O. Ozawa, K. Ohtsuka & T. Uchida (1989). Production of 4'-galactosyllactose by mixed cells of *Cryptococcus laurentii* and Baker's Yeast. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 36 (11), 898-902.
- [186] Anonym (2010). GRAS Notification GRN No. 334 for GOS, Prepared for Yakult Pharmaceutical Ind. Co., LTD. Online unter: <http://wayback.archive-it.org/7993/20171031050145/https://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/UCM269519.pdf>, zugegriffen am 4.6.2018.
- [187] S. Tomiuk (2017). Method for producing galactooligosaccharides from lactose. Patent-Nr.: WO 2017/120678 A1.
- [188] L. Santibáñez, L. Fernández-Arrojo, C. Guerrero, F.J. Plou & A. Illanes (2016). Removal of lactose in crude galacto-oligosaccharides by  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 133, 85-91.
- [189] J.W. Moon, K.T. Huh, S.W. Lee & J.Y. Lee (1995). A study on the galactooligosaccharides produced from transgalactosylation with  $\beta$ -Galactosidase of *Aspergillus* and *Kluyveromyces*. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 27 (3), 271-280.
- [190] S.S. Van Leeuwen, B.J.H. Kuipers, L. Dijkhuizen & J.P. Kamerling (2016). Comparative structural characterization of 7 commercial galacto-oligosaccharide (GOS) products. *Carbohydrate Research*, 425, 48-58.
- [191] O. Hernández, A.I. Ruiz-Matute, A. Olano, F.J. Moreno & M.L. Sanz (2009). Comparison of fractionation techniques to obtain prebiotic galactooligosaccharides. *International Dairy Journal*, 19 (9), 531-536.
- [192] S.B. Bankar, M.V. Bule, R.S. Singhal & L. Ananthanarayan (2009). Glucose oxidase - An overview. *Biotechnology Advances*, 27 (4), 489-501.

- [193] C.C. Cheng, M.C. Yu, T.C. Cheng, D.C. Sheu, K.J. Duan & W.L. Tai (2006). Production of high-content galacto-oligosaccharide by enzyme catalysis and fermentation with *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnology Letters*, 28 (11), 793-797.
- [194] F. Rico-Rodríguez, J.C. Serrato, A. Montilla & M. Villamiel (2018). Impact of ultrasound on galactooligosaccharides and gluconic acid production throughout a multienzymatic system. *Ultrasonics Sonochemistry*, 44, 177-183.
- [195] I. Mueller, G. Kiedorf, E. Runne, I. Pottratz, A. Seidel-Morgenstern & C. Hamel (2018). Process Control and Yield Enhancement of the Galacto-Oligosaccharide Formation. *Chemie-Ingenieur-Technik*, 90 (5), 725-730.
- [196] Anonym (2009). GRAS Notification GRN No. 285. Online unter: <http://wayback.archive-it.org/7993/20171031051014/https://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/UCM269255.pdf>, zugegriffen am 7.9.2011.
- [197] Anonym (2014). GRAS Notification GRN No. 489. Online unter: <http://wayback.archive-it.org/7993/20171031055001/https://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm381400.pdf>, zugegriffen am 14.8.2018.
- [198] G. Tzortzis, A.K. Goulas & T. Goulas (2007). Beta-Galactosidase mit Transgalactosylierungsaktivität. Patent-Nr.: EP1999254B1.
- [199] A.G. Wynne, G. Gibson, J.W. Slupinski & G. Tzortzis (2004). Neue Galactooligosaccharidzusammensetzung und Herstellung davon. Patent-Nr.: EP1644482B1.
- [200] Anonym (2016). GRAS Notification GRN No. 620. Online unter: [www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm504605.pdf](http://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm504605.pdf), zugegriffen am 14.8.2018.
- [201] Anonym (2017). GRAS Notification GRN No. 671. Online unter: [www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm525903.pdf](http://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm525903.pdf), zugegriffen am 4.6.2018.
- [202] Anonym (2017). GRAS Notification GRN No. 721. Online unter: [www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm593674.pdf](http://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm593674.pdf), zugegriffen am 4.6.2018.
- [203] Anonym (2014). GRAS Notification GRN No. 495. Online unter: <http://wayback.archive-it.org/7993/20171031042622/https://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/UCM386769.pdf>, zugegriffen am 14.8.2018.
- [204] F. Depeint, G. Tzortzis, J. Vulevic, K. I'Anson & G.R. Gibson (2008). Prebiotic evaluation of a novel galactooligosaccharide mixture produced by the enzymatic activity of *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171, in healthy humans: A randomized, double-blind, crossover, placebo-controlled intervention study. *American Journal of Clinical Nutrition*, 87 (3), 785-791.
- [205] Anonym (2009). GRAS Notification GRN No. 286. Online unter: <http://wayback.archive-it.org/7993/20171031055001/https://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm269263.pdf>, zugegriffen am 6.7.2011.
- [206] Anonym (2014). BIOLIGO™ GL 5700 IMF technical specification. Online unter: [www.ingredient.us/ingredients/na/bioligo-gl5700-imf-11300400.html](http://www.ingredient.us/ingredients/na/bioligo-gl5700-imf-11300400.html), zugegriffen am 14.8.2018.
- [207] Anonym (2014). GRAS Notification GRN No. 518. Online unter: <http://wayback.archive-it.org/7993/20171031055001/https://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm409795.pdf>, zugegriffen am 20.11.2017.
- [208] Anonym (2015). GRAS Notification GRN No. 569. Online unter: <http://wayback.archive-it.org/7993/20171031055001/https://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm475293.pdf>, zugegriffen am 14.8.2018.

- [209] Anonym (2018). GRAS Notification GRN No. 729. Online unter: [www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm601917.pdf](http://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm601917.pdf), zugegriffen am 4.6.2018.
- [210] R. Hartemink, K.M.J. Van Laere, C.C.K.M. Peeters, M.J.R. Nout & F.M. Rombouts (1997). In vitro cariogenicity of trans-galactosyl-oligosaccharides. *Letters in Applied Microbiology*, 25 (1), 38-42.
- [211] Anonym (2017). Cup-Oligo Produktdatenblatt. Online unter: [www.nissin-sugar.co.jp/english/pdf/product/oligo/cup\\_oligo.pdf](http://www.nissin-sugar.co.jp/english/pdf/product/oligo/cup_oligo.pdf), zugegriffen am 6.11.2017.
- [212] Anonym (2018). GOS Gut Health. Online unter: [www.promovitaingredients.co.uk](http://www.promovitaingredients.co.uk), zugegriffen am 14.8.2018.
- [213] V. Sangwan, S.K. Tomar, R.R.B. Singh, A.K. Singh & B. Ali (2011). Galactooligosaccharides: Novel Components of Designer Foods. *Journal of Food Science*, 76 (4), R103-R111.
- [214] Anonym (2018). Oligomate® Product information. Online unter: [www.yakult.co.jp/yapi/en/product/ori.html](http://www.yakult.co.jp/yapi/en/product/ori.html), zugegriffen am 16.8.2018.
- [215] Anonym (2008). GRAS Notification GRN No. 236 for GOS Friesland Foods Domo. Online unter: <http://wayback.archive-it.org/7993/20171031055401/https://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/UCM264094.pdf>, zugegriffen am 27.6.2011.
- [216] Anonym (2018). GOS Application Sheet - Yoghurts with Promovita® Galacto-oligosaccharides (GOS). Online unter: [www.promovitaingredients.co.uk/documents/Yoghurts.pdf](http://www.promovitaingredients.co.uk/documents/Yoghurts.pdf), zugegriffen am 14.8.2018.
- [217] T. Stortz (s.l.). Introducing Purimune™ prebiotic GOS (Vortragsskript). GTC Nutrition.
- [218] Anonym (2014). GRAS Notification GRN No. 484. Online unter: <http://wayback.archive-it.org/7993/20171031055001/https://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm379675.pdf>, zugegriffen am 14.8.2018.
- [219] K. Brunt (2009). Pitfall in the determination of the dietary fibre content and nutritional value of food products. *Quality Assurance and Safety of Crops and Foods*, 1 (4), 225-230.
- [220] Y. Sonoike, T. Kobayashi, H. Kato & T. Kan (1994). Method of producing bread containing oligosaccharide. Patent-Nr.: EP0343975B1.
- [221] Anonym (2012). Alixir - Tabelle Nutrizionali. Online unter: [www.alixir.it](http://www.alixir.it), zugegriffen am 6.2.2012.
- [222] R. Klewicki (2007). The stability of gal-polyols and oligosaccharides during pasteurization at a low pH. *LWT - Food Science and Technology*, 40 (7), 1259-1265.
- [223] P.C. Belsito, M.V.S. Ferreira, L.P. Cappato, et al. (2017). Manufacture of *Requeijão cremoso* processed cheese with galactooligosaccharide. *Carbohydrate Polymers*, 174, 869-875.
- [224] C.F. Balthazar, H.L.A. Silva, R.M.S. Celeguini, et al. (2015). Effect of galactooligosaccharide addition on the physical, optical, and sensory acceptance of vanilla ice cream. *Journal of Dairy Science*, 98 (7), 4266-4272.
- [225] C.F. Balthazar, H.L.A. Silva, A.H. Vieira, et al. (2017). Assessing the effects of different prebiotic dietary oligosaccharides in sheep milk ice cream. *Food Research International*, 91, 38-46.
- [226] C.F. Balthazar, H.L.A. Silva, R.N. Cavalcanti, et al. (2017). Prebiotics addition in sheep milk ice cream: A rheological, microstructural and sensory study. *Journal of Functional Foods*, 35, 564-573.
- [227] L.N. Prasad, F. Sherkat & N.P. Shah (2013). Influence of Galactooligosaccharides and Modified Waxy Maize Starch on Some Attributes of Yogurt. *Journal of Food Science*, 78 (1), M77-M83.
- [228] T. Toba, A. Watanabe & S. Adachi (1982). Allolactose and 6-O-β-D-Galactopyranosyl-D-Galactose in Commercial Yogurt. *Journal of Dairy Science*, 65 (5), 702-706.

- [229] C. Martínez-Villaluenga, A. Cardelle-Cobas, N. Corzo & A. Olano (2008). Study of galactooligosaccharide composition in commercial fermented milks. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21 (7), 540-544.
- [230] A.I. Ruiz-Matute, M. Corzo-Martínez, A. Montilla, A. Olano, P. Copovi & N. Corzo (2012). Presence of mono-, di- and galactooligosaccharides in commercial lactose-free UHT dairy products. *Journal of Food Composition and Analysis*, 28 (2), 164-169.
- [231] T. Toba, K. Arihara & S. Adachi (1986). Quantitative Changes in Oligosaccharides During Fermentation and Storage of Yogurt Inoculated Simultaneously with Starter Culture and  $\beta$ -Galactosidase Preparation. *Journal of Dairy Science*, 69 (5), 1241-1245.
- [232] C.I. Vénica, C.V. Bergamini, S.R. Rebecchi & M.C. Perotti (2015). Galacto-oligosaccharides formation during manufacture of different varieties of yogurt. Stability through storage. *LWT - Food Science and Technology*, 63 (1), 198-205.
- [233] L. Lamoureux, D. Roy & S.F. Gauthier (2002). Production of oligosaccharides in yogurt containing bifidobacteria and yogurt cultures. *Journal of Dairy Science*, 85 (5), 1058-1069.
- [234] S. Staley & L. Mallee (2012). Market trends and developments in prebiotics: focusing on galacto-oligosaccharides *Pre- & Probiotics 2012*. Virtual Conference, 1.2.2012.
- [235] R. González, E.S. Klaassens, E. Mahnen, W.M. De Vos & E.E. Vaughan (2008). Differential transcriptional response of *Bifidobacterium longum* to human milk, formula milk, and galactooligosaccharide. *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (15), 4686-4694.
- [236] G. Boehm, B. Stahl, J. Jelinek, J. Knol, V. Miniello & G.E. Moro (2005). Prebiotic carbohydrates in human milk and formulas. *Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics, Supplement*, 94 (449), 18-21.
- [237] M. Grabarics, O. Csernák, R. Balogh & S. Béni (2017). Analytical characterization of human milk oligosaccharides – potential applications in pharmaceutical analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 146, 168-178.
- [238] A. Martinez-Ferez, A. Guadix & E.M. Guadix (2006). Recovery of caprine milk oligosaccharides with ceramic membranes. *Journal of Membrane Science*, 276 (1-2), 23-30.
- [239] L. Bode (2012). Human milk oligosaccharides: Every baby needs a sugar mama. *Glycobiology*, 22 (9), 1147-1162.
- [240] S. Sarkar (2007). Potential of prebiotics as functional foods - A review. *Nutrition and Food Science*, 37 (3), 168-177.
- [241] Anonym (2018). Humana-Produkte. Online unter: [www.humana.de/de/produkte/produktfinder](http://www.humana.de/de/produkte/produktfinder), zugegriffen am 17.8.2018.
- [242] Anonym (2018). Milupa-Produkte. Online unter: <https://milupa.de/produkte/>, zugegriffen am 17.8.2018.
- [243] G. Boehm, S. Fanaro, J. Jelinek, B. Stahl & A. Marini (2003). Prebiotic concept for infant nutrition. *Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics, Supplement*, 91 (441), 64-67.
- [244] Anonym (2018). Nestlé BEBA Produktübersicht. Online unter: [www.babyservice.de/nestle-beba-produktuebersicht](http://www.babyservice.de/nestle-beba-produktuebersicht), zugegriffen am 28.8.2018.
- [245] X.M. Ben, X.Y. Zhou, W.H. Zhao, W.L. Yu, W. Pan, W.L. Zhang, S.M. Wu, C.M. Van Beusekom & A. Schaafsma (2004). Supplementation of milk formula with galacto-oligosaccharides improves intestinal micro-flora and fermentation in term infants. *Chinese Medical Journal*, 117 (6), 927-931.
- [246] B. Vivatvakin, A. Mahayosnond, A. Theamboonlers, P.G. Steenhout & N.J. Conus (2010). Effect of a whey-predominant starter formula containing LCPUFAs and oligosaccharides (FOS/GOS) on gastrointestinal comfort in infants. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 19 (4), 473-480.

- [247] P.A.M.J. Scholtens, M.S. Alles, J.G. Bindels, E.G.M. Van Der Linde, J.J.M. Tolboom & J. Knol (2006). Bifidogenic effects of solid weaning foods with added prebiotic oligosaccharides: A randomised controlled clinical trial. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 42 (5), 553-559.
- [248] P.A.M.J. Scholtens, P. Alliet, M. Raes, M.S. Alles, H. Kroes, G. Boehm, L.M.J. Knippels, J. Knol & Y. Vandenplas (2008). Fecal secretory immunoglobulin A is increased in healthy infants who receive a formula with short-chain galacto-oligosaccharides and long-chain fructo-oligosaccharides. *Journal of Nutrition*, 138 (6), 1141-1147.
- [249] X.M. Ben, J. Li, Z.T. Feng, S.Y. Shi, Y.D. Lu, R. Chen & X.Y. Zhou (2008). Low level of galacto-oligosaccharide in infant formula stimulates growth of intestinal *Bifidobacteria* and *Lactobacilli*. *World Journal of Gastroenterology*, 14 (42), 6564-6568.
- [250] G.E. Moro, B. Stahl, S. Fanaro, J. Jelinek, G. Boehm & G.V. Coppa (2005). Dietary prebiotic oligosaccharides are detectable in the faeces of formula-fed infants. *Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics, Supplement*, 94 (449), 27-30.
- [251] J. Knol, P. Scholtens, C. Kafka, et al. (2005). Colon microflora in infants fed formula with galacto- and fructo-oligosaccharides: More like breast-fed infants. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 40 (1), 36-42.
- [252] J. Knol, G. Boehm, M. Lidestri, F. Negretti, J. Jelinek, M. Agosti, B. Stahl, A. Marini & F. Mosca (2005). Increase of faecal bifidobacteria due to dietary oligosaccharides induces a reduction of clinically relevant pathogen germs in the faeces of formula-fed preterm infants. *Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics, Supplement*, 94 (449), 31-33.
- [253] G.E. Moro, F. Mosca, V. Miniello, S. Fanaro, J. Jelinek, B. Stahl & G. Boehm (2003). Effects of a new mixture of prebiotics on faecal flora and stools in term infants. *Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics, Supplement*, 91 (441), 77-79.
- [254] A.M. Bakker-Zierikzee, M.S. Alles, J. Knol, F.J. Kok, J.J.M. Tolboom & J.G. Bindels (2005). Effects of infant formula containing a mixture of galacto- and fructo-oligosaccharides or viable *Bifidobacterium animalis* on the intestinal microflora during the first 4 months of life. *British Journal of Nutrition*, 94 (5), 783-790.
- [255] N. Nakamura, H.R. Gaskins, C.T. Collier, et al. (2009). Molecular ecological analysis of fecal bacterial populations from term infants fed formula supplemented with selected blends of prebiotics. *Applied and Environmental Microbiology*, 75 (4), 1121-1128.
- [256] E. Bruzzese, M. Volpicelli, V. Squeglia, et al. (2009). A formula containing galacto- and fructo-oligosaccharides prevents intestinal and extra-intestinal infections: An observational study. *Clinical Nutrition*, 28 (2), 156-161.
- [257] I. Shahramian, G. Kalvandi, H. Javaherizadeh, M. Khalili, N.M. Noori, M. Delaramnasab & A. Bazi (2018). The effects of prebiotic supplementation on weight gain, diarrhoea, constipation, fever and respiratory tract infections in the first year of life. *Journal of Paediatrics and Child Health*, 54 (8), 875-880.
- [258] S. Arslanoglu, G.E. Moro & G. Boehm (2007). Early supplementation of prebiotic oligosaccharides protects formula-fed infants against infections during the first 6 months of life. *Journal of Nutrition*, 137 (11), 2420-2424.
- [259] M.M. Rinne, M. Gueimonde, M. Kalliomäki, U. Hoppu, S.J. Salminen & E. Isolauri (2005). Similar bifidogenic effects of prebiotic-supplemented partially hydrolyzed infant formula and breastfeeding on infant gut microbiota. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 43 (1), 59-65.
- [260] M. Ito, Y. Deguchi, A. Miyamori, K. Matsumoto, H. Kikuchi, K. Matsumoto, Y. Kobayashi, T. Yajima & T. Kan (1990). Effects of Administration of Galactooligosaccharides on the Human Faecal Microflora, Stool Weight and - Abdominal Sensation. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 3, 285-292.

- [261] M. Alander, J. Mättö, W. Kneifel, M. Johansson, B. Kögler, R. Crittenden, T. Mattila-Sandholm & S. M. (2001). Effect of galacto-oligosaccharide supplementation on human faecal microflora and on survival and persistence of *Bifidobacterium lactis* Bb-12 in the gastrointestinal tract *International Dairy Journal*, 11 (10), 817-825
- [262] J.A. Krumbeck, H.E. Rasmussen, R.W. Hutkins, J. Clarke, K. Shawron, A. Keshavarzian & J. Walter (2018). Probiotic *Bifidobacterium* strains and galactooligosaccharides improve intestinal barrier function in obese adults but show no synergism when used together as synbiotics. *Microbiome*, 6 (1), 1-16.
- [263] E.G.H.M. Van Den Heuvel, M.H.C. Schoterman & T. Muijs (2000). Transgalactooligosaccharides stimulate calcium absorption in postmenopausal women. *Journal of Nutrition*, 130 (12), 2938-2942.
- [264] D.B.A. Silk, A. Davis, J. Vulevic, G. Tzortzis & G.R. Gibson (2009). Clinical trial: The effects of a trans-galactooligosaccharide prebiotic on faecal microbiota and symptoms in irritable bowel syndrome. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 29 (5), 508-518.
- [265] L.M.G. Davis, I. Martínez, J. Walter & R. Hutkins (2010). A dose dependent impact of prebiotic galactooligosaccharides on the intestinal microbiota of healthy adults. *International Journal of Food Microbiology*, 144 (2), 285-292.
- [266] B. Santoso, S. Kume, K. Nonaka, Y. Gamo, K. Kimura & J. Takahashi (2003). Influence of  $\beta$  1-4 galacto-oligosaccharides supplementation on nitrogen utilization, rumen fermentation, and microbial nitrogen supply in dairy cows fed silage. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 16 (8), 1137-1142.
- [267] S. Varasteh, S. Braber, P. Akbari, J. Garssen & J. Fink-Gremmels (2015). Differences in susceptibility to heat stress along the chicken intestine and the protective effects of galacto-oligosaccharides. *PLoS ONE*, 10 (9), 1-18.
- [268] M.R. Smiricky-Tjardes, C.M. Grieshop, E.A. Flickinger, L.L. Bauer & G.C. Fahey Jr (2003). Dietary galactooligosaccharides affect ileal and total-tract nutrient digestibility, ileal and fecal bacterial concentrations, and ileal fermentative characteristics of growing pigs. *Journal of Animal Science*, 81 (10), 2535-2545.
- [269] B. Mwenya, B. Santoso, C. Sar, Y. Gamo, T. Kobayashi, I. Arai & J. Takahashi (2004). Effects of including  $\beta$ 1-4 galacto-oligosaccharides, lactic acid bacteria or yeast culture on methanogenesis as well as energy and nitrogen metabolism in sheep. *Animal Feed Science and Technology*, 115 (3-4), 313-326.
- [270] I. Guerreiro, C.R. Serra, P. Pousão-Ferreira, A. Oliva-Teles & P. Enes (2018). Prebiotics effect on growth performance, hepatic intermediary metabolism, gut microbiota and digestive enzymes of white sea bream (*Diplodus sargus*). *Aquaculture Nutrition*, 24 (1), 153-163.
- [271] T.G. Huynh, C.C. Chi, T.P. Nguyen, T.T.T.H. Tran, A.C. Cheng & C.H. Liu (2018). Effects of synbiotic containing *Lactobacillus plantarum* 7-40 and galactooligosaccharide on the growth performance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Research*, 49 (7), 2416-2428.
- [272] M.H. Wilbrink, G.A. Ten Kate, P. Sanders, et al. (2015). Enzymatic Decoration of Prebiotic Galacto-oligosaccharides (Vivinal GOS) with Sialic Acid Using *Trypanosoma cruzi* trans-Sialidase and Two Bovine Sialoglycoconjugates as Donor Substrates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63 (25), 5976-5984.
- [273] T. Hennet & L. Borsig (2016). Breastfed at Tiffany's. *Trends in Biochemical Sciences*, 41 (6), 508-518.
- [274] T. Urashima, T. Saito, T. Nakamura & M. Messer (2001). Oligosaccharides of milk and colostrum in non-human mammals. *Glycoconjugate Journal*, 18 (5), 357-371.

- [275] D.S. Newburg, J.S. Ko, S. Leone & N.N. Nanthakumar (2016). Human milk oligosaccharides and synthetic galactosyloligosaccharides contain 3'-, 4-, and 6'-galactosyllactose and attenuate inflammation in human T84, NCM-460, and H4 cells and intestinal tissue ex vivo. *Journal of Nutrition*, 146 (2), 358-367.
- [276] M. Elwakiel, J.A. Hageman, W. Wang, I.M. Szeto, J.B. Van Goudoever, K.A. Hettinga & H.A. Schols (2018). Human Milk Oligosaccharides in Colostrum and Mature Milk of Chinese Mothers: Lewis Positive Secretor Subgroups. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66 (27), 7036-7043.
- [277] M.K. McGuire, C.L. Meehan, M.A. McGuire, et al. (2017). What's normal? Oligosaccharide concentrations and profiles in milk produced by healthy women vary geographically. *American Journal of Clinical Nutrition*, 105 (5), 1086-1100.
- [278] B. Wang, J. Brand-Miller, P. McVeagh & P. Petocz (2001). Concentration and distribution of sialic acid in human milk and infant formulas. *American Journal of Clinical Nutrition*, 74 (4), 510-515.
- [279] C. Kunz, S. Rudloff, W. Baier, N. Klein & S. Strobel (2000). Oligosaccharides in human milk: Structural, functional, and metabolic aspects. *Annual Review of Nutrition*, 20, 699-722.
- [280] R.M. Nijman, Y. Liu, A. Bunyatratchata, J.T. Smilowitz, B. Stahl & D. Barile (2018). Characterization and Quantification of Oligosaccharides in Human Milk and Infant Formula. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66 (26), 6851-6859.
- [281] B. Wang (2009). Sialic acid is an essential nutrient for brain development and cognition. *Annual Review of Nutrition*, 29, 177-222.
- [282] C.A. Autran, M.H.C. Schoterman, E. Jantscher-Krenn, J.P. Kamerling & L. Bode (2016). Sialylated galacto-oligosaccharides and 2'-fucosyllactose reduce necrotising enterocolitis in neonatal rats. *British Journal of Nutrition*, 116 (2), 294-299.
- [283] C.A. Autran, B.P. Kellman, J.H. Kim, et al. (2018). Human milk oligosaccharide composition predicts risk of necrotising enterocolitis in preterm infants. *Gut*, 67 (6), 1064-1070.
- [284] J. Holck, D.M. Larsen, M. Michalak, et al. (2014). Enzyme catalysed production of sialylated human milk oligosaccharides and galactooligosaccharides by *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. *New Biotechnology*, 31 (2), 156-165.
- [285] Y. Wang, K. Jiang, H. Ma, W. Zeng, P.G. Wang, N. Yao, W. Han, J. Cheng & W. Wang (2015). Enzymatic production of HMO mimics by the sialylation of galacto-oligosaccharides. *Food Chemistry*, 181, 51-56.
- [286] B. Zeuner, J. Holck, V. Perna, J.D. Mikkelsen & A.S. Meyer (2016). Quantitative enzymatic production of sialylated galactooligosaccharides with an engineered sialidase from *Trypanosoma rangeli*. *Enzyme and Microbial Technology*, 82, 42-50.
- [287] Y. Guo, C. Jers, A.S. Meyer, A. Arnous, H. Li, F. Kirpekar & J.D. Mikkelsen (2014). A *Pasteurella multocida* sialyltransferase displaying dual trans-sialidase activities for production of 3'-sialyl and 6'-sialyl glycans. *Journal of Biotechnology*, 170 (1), 60-67.
- [288] E. Sallomons & M.H. Wilbrink (2012). Methods for providing sialylated oligosaccharides. Patent-Nr.: EP2787838B1.
- [289] M.H. Wilbrink, G.A. ten Kate, S.S. van Leeuwen, P. Sanders, E. Sallomons, J.A. Hage, L. Dijkhuizen & J.P. Kamerling (2014). Galactosyl-Lactose Sialylation Using *Trypanosoma cruzi* trans-Sialidase as the Biocatalyst and Bovine  $\kappa$ -Casein-Derived Glycomacropeptide as the Donor Substrate. *Applied and Environmental Microbiology*, 80 (19), 5984-5991.
- [290] C. Jers, M. Michalak, D.M. Larsen, K.P. Kepp, H. Li, Y. Guo, F. Kirpekar, A.S. Meyer & J.D. Mikkelsen (2014). Rational design of a new *Trypanosoma rangeli* trans-sialidase for efficient sialylation of glycans. *PLoS ONE*, 9 (1), 1-11.



- [291] S.L. Arreola, M. Intanon, P. Wongputtisin, P. Kosma, D. Haltrich & T.H. Nguyen (2016). Transferase Activity of Lactobacillal and Bifidobacterial  $\beta$ -Galactosidases with Various Sugars as Galactosyl Acceptors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64 (12), 2604-2611.
- [292] S. Reuter, A. Rusborg Nygaard & W. Zimmermann (1999).  $\beta$ -Galactooligosaccharide synthesis with  $\beta$ -galactosidases from *Sulfolobus solfataricus*, *Aspergillus oryzae*, and *Escherichia coli*. *Enzyme and Microbial Technology*, 25 (6), 509-516.
- [293] A. Usvalampi, H. Maaheimo, O. Tossavainen & A.D. Frey (2018). Enzymatic synthesis of fucose-containing galacto-oligosaccharides using  $\beta$ -galactosidase and identification of novel disaccharide structures. *Glycoconjugate Journal*, 35 (1), 31-40.
- [294] C. Schwab, V. Lee, K.I. Sørensen & M.G. Gänzle (2011). Production of galactooligosaccharides and heterooligosaccharides with disrupted cell extracts and whole cells of lactic acid bacteria and bifidobacteria. *International Dairy Journal*, 21 (10), 748-754.
- [295] W. Li, Y. Sun, H. Ye & X. Zeng (2010). Synthesis of oligosaccharides with lactose and N-acetylglucosamine as substrates by using  $\beta$ -d-galactosidase from *Bacillus circulans*. *European Food Research and Technology*, 231 (1), 55-63.
- [296] B. Zeuner, C. Nyffenegger, J.D. Mikkelsen & A.S. Meyer (2016). Thermostable  $\beta$ -galactosidases for the synthesis of human milk oligosaccharides. *New Biotechnology*, 33 (3), 355-360.
- [297] P.K. Gopal & H.S. Gill (2000). Oligosaccharides and glycoconjugates in bovine milk and colostrum. *British Journal of Nutrition*, 84 (SUPPL. 1), S69-S74.
- [298] R. Mehra, D. Barile, M. Marotta, C.B. Lebrilla, C. Chu & J.B. German (2014). Novel high-molecular weight fucosylated milk oligosaccharides identified in dairy streams. *PLoS ONE*, 9 (5), 1-7.
- [299] NDA (2015). Statement on the safety of lacto-N-neotetraose and 2'-O-fucosyllactose as novel food ingredients in food supplements for children. *EFSA Journal*, 13 (11), 1-11.
- [300] NDA (2015). Safety of 2'-O-fucosyllactose as a novel food ingredient pursuant to Regulation (EC) No 258/97. *EFSA Journal*, 13 (7), 1-32.
- [301] NDA (2015). Safety of lacto-N-neotetraose as a novel food ingredient pursuant to Regulation (EC) No 258/97. *EFSA Journal*, 13 (7), 1-32.
- [302] Anonym (2016). GRAS Notification GRN No. 650 - GRAS Exemption Claim for 2'-O-Fucosyllactose (2'-FL) Produced by Fermentation. Online unter: [www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm513832.pdf](http://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm513832.pdf), zugegriffen am 28.8.2018.
- [303] Anonym (2015). GRAS Notification GRN No. 571 - GRAS Exemption Claim for Use of 2'-Fucosyllactose (2'-FL) in Term Infant and Toddler Formulas. Online unter: <http://wayback.archive-it.org/7993/20171031041333/https://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/UCM461885.pdf>, zugegriffen am 28.8.2018.
- [304] Anonym (2018). GRAS Notification GRN No. 735 - Purified 2'-Fucosyllactose (2'-FL). Online unter: [www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm617298.PDF](http://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm617298.PDF), zugegriffen am 28.8.2018.
- [305] Anonym (2018). Agency Response Letter GRAS Notice No. GRN 000749. Online unter: <https://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm607735.pdf>, zugegriffen am 28.8.2018.
- [306] Anonym (2016). GRAS Notification GRN No. 659 - GRAS Exemption Claim for Lacto-N-neotetraose (LNnT) Produced by Fermentation. Online unter: [www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm517673.pdf](http://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm517673.pdf), zugegriffen am 28.8.2018.

- [307] Anonym (2018). CARE4U™ Human milk oligosaccharide for infant and toddler formula. Online unter: [http://cdn.danisco.com/fileadmin/user\\_upload/danisco/documents/products/DNH\\_Danisco\\_HO\\_HMO\\_HO9056-FINAL.pdf](http://cdn.danisco.com/fileadmin/user_upload/danisco/documents/products/DNH_Danisco_HO_HMO_HO9056-FINAL.pdf), zugegriffen am 28.8.2018.
- [308] Anonym (2017). Welcome to the HiMOexperience program. Online unter: [www.himoexperience.com](http://www.himoexperience.com), zugegriffen am 27.8.2018.
- [309] Anonym (2018). Aequival® 2'-FL product data sheet. Online unter: [www.domo.nl/app/uploads/2018/07/DOMO\\_Product-Data-Sheet-Aequival-2-FL.pdf](http://www.domo.nl/app/uploads/2018/07/DOMO_Product-Data-Sheet-Aequival-2-FL.pdf), zugegriffen am 28.8.2018.
- [310] Anonym (2018). Mum's Sweet Secret - die Marke für humane Milch-Oligosaccharide. Online unter: <http://mums-sweet-secret.com/de>, zugegriffen am 27.8.2018.
- [311] Anonym (2018). Similac-Produkte. Online unter: <https://similac.com/baby-formula#tabs-section>, zugegriffen am 28.8.2018.
- [312] J. Kjeldahl (1883). Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern. *Zeitschrift für Analytische Chemie*, 22 (1), 366-382.
- [313] M.A.J.S. Van Boekel & B. Ribadeau-Dumas (1987). Addendum to the evaluation of the Kjeldahl factor for conversion of the nitrogen content of milk and milk products to protein content. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 40, 281-284.
- [314] A.H. Karman & M.A.J.S. Van Boekel (1986). Evaluation of the Kjeldahl factor for conversion of the nitrogen content of milk and milk products to protein content. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 40, 315-336.
- [315] R. Matissek, G. Steiner & M. Fischer (2014). Fette, Fettbegleitstoffe. In: *Lebensmittelanalytik*, Hrsg: N.N., Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 196-197.
- [316] M.M. Bradford (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72 (1-2), 248-254.
- [317] P.M. Nielsen, D. Petersen & C. Dambmann (2001). Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *Journal of Food Science*, 66 (5), 642-646.
- [318] Anonym (1996). Enzymatic Assay of Glucose Oxidase (EC 1.1.3.4). Online unter: [www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Enzyme\\_Assay/g6641enz.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Enzyme_Assay/g6641enz.pdf), zugegriffen am 1.6.2018.
- [319] Anonym (2017). Enzymatic Assay of Catalase (EC 1.11.1.6). Online unter: [www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/enzymatic-assay-of-catalase.html](http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/enzymatic-assay-of-catalase.html), zugegriffen am 8.12.2017.
- [320] H.G. Kessler (1988). Erhitzen und Auswirkungen. In: *Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik - Molkereitechnologie*, Hrsg: N.N., Freising, Verlag A. Kessler. 132-195.
- [321] H.I. Assaad, L. Zhou, R.J. Carroll & G. Wu (2014). Rapid publication-ready MS-Word tables for one-way ANOVA. *SpringerPlus*, 3 (1), 1-8.
- [322] A. Warmerdam, R.M. Boom & A.E.M. Janssen (2013).  $\beta$ -galactosidase stability at high substrate concentrations. *SpringerPlus*, 2 (1), 1-8.
- [323] A.R.C. Braga, M.F. Silva, J.V. Oliveira, H. Treichel & S.J. Kalil (2012). Effect of compressed fluids treatment on  $\beta$ -galactosidase activity and stability. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 35 (9), 1541-1547.
- [324] K. Pociďřovř, L. řurda, D. Miřřn, A. Dryřkovř & L. Dibřřkovř (2010). Preparation of galactooligosaccharides using membrane reactor. *Journal of Food Engineering*, 99 (4), 479-484.
- [325] M. Adamczak, D. Charubin & W. Bednarski (2009). Influence of reaction medium composition on enzymatic synthesis of galactooligosaccharides and lactulose from lactose concentrates prepared from whey permeate. *Chemical Papers*, 63 (2), 111-116.

- [326] L. Lu, G. Gu, M. Xiao & F. Wang (2010). Separation and structure analysis of trisaccharide isomers produced from lactose by *Lactobacillus bulgaricus* L3  $\beta$ -galactosidase. *Food Chemistry*, 121 (4), 1283-1288.
- [327] J. Mirón, M.P. González, J.A. Vázquez, L. Pastrana & M.A. Murado (2004). A mathematical model for glucose oxidase kinetics, including inhibitory, deactivant and diffusional effects, and their interactions. *Enzyme and Microbial Technology*, 34 (5), 513-522.
- [328] F. Benjamins (2014). Galacto-oligosaccharide synthesis using immobilized  $\beta$ -galactosidase. Dissertation, University of Groningen. Online unter: <http://hdl.handle.net/11370/fe53938a-d9a5-46b2-b32a-ab696da05213>.
- [329] S.I. Aspmo, S.J. Horn & V.G.H. Eijsink (2005). Use of hydrolysates from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera as a complex nitrogen source for lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 248 (1), 65-68.
- [330] T. Vasiljevic & P. Jelen (2001). Production of  $\beta$ -galactosidase for lactose hydrolysis in milk and dairy products using thermophilic lactic acid bacteria. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2 (2), 75-85.
- [331] M. Mercade, F. Duperray & P. Loubière (2003). Transient self-inhibition of the growth of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in a pH-regulated fermentor. *Biotechnology and Bioengineering*, 84 (1), 78-87.
- [332] C. Schiraldi, V. Adduci, V. Valli, C. Maresca, M. Giuliano, M. Lamberti, M. Cartenì & M. De Rosa (2003). High cell density cultivation of probiotics and lactic acid production. *Biotechnology and Bioengineering*, 82 (2), 213-222.
- [333] Z. Ai, X. Lv, S. Huang, G. Liu, X. Sun, H. Chen, J. Sun & Z. Feng (2017). The effect of controlled and uncontrolled pH cultures on the growth of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *LWT - Food Science and Technology*, 77, 269-275.
- [334] E.A. Elsayed, N.Z. Othman, R. Malek, T. Tang & H.A. El Enshasy (2014). Improvement of cell mass production of *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* WICC-B-02: A newly isolated probiotic strain from mother's milk. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 4 (11), 8-14.
- [335] C. Tari, F.I. Ustok & S. Harsa (2009). Optimization of the associative growth of novel yoghurt cultures in the production of biomass,  $\beta$ -galactosidase and lactic acid using response surface methodology. *International Dairy Journal*, 19 (4), 236-243.
- [336] P. Nakkharat & D. Haltrich (2006). Purification and characterisation of an intracellular enzyme with  $\beta$ -glucosidase and  $\beta$ -galactosidase activity from the thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus* CBS 236.58. *Journal of Biotechnology*, 123 (3), 304-313.
- [337] M. Nakao, M. Harada, Y. Kodama, T. Nakayama, Y. Shibano & T. Amachi (1994). Purification and characterization of a thermostable  $\beta$ -galactosidase with high transgalactosylation activity from *Saccharopolyspora rectivirgula*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 40 (5), 657-663.
- [338] R.M. Adams, S. Yoast, S.E. Mainzer, K. Moon, A.L. Palombella, D.A. Estell, S.D. Power & B.F. Schmidt (1994). Characterization of two cold-sensitive mutants of the  $\beta$ -galactosidase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Journal of Biological Chemistry*, 269 (8), 5666-5672.
- [339] P. Chanalía, D. Gandhi, P. Attri & S. Dhanda (2018). Purification and characterization of  $\beta$ -galactosidase from probiotic *Pediococcus acidilactici* and its use in milk lactose hydrolysis and galactooligosaccharide synthesis. *Bioorganic Chemistry*, 77, 176-189.
- [340] A. Vetere & S. Paoletti (1998). Separation and characterization of three  $\beta$ -galactosidases from *Bacillus circulans*. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1380 (2), 223-231.
- [341] Y. Gezgin, B. Tanyolac & R. Eltem (2013). Some Characteristics and Isolation of Novel Thermostable  $\beta$ -Galactosidase from *Thermus oshimai* DSM 12092. *Food Science and Biotechnology*, 22 (1), 63-70.

- [342] K. Xu, X. Tang, Y. Gai, M.A. Mehmood, X. Xiao & F. Wang (2011). Molecular Characterization of Cold-Inducible  $\beta$ -Galactosidase from *Arthrobacter* sp. ON14 Isolated from Antarctica. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21 (3), 236-242.
- [343] R. Madani, Zarif-fard, M.R., Golchin-far, F. (1999). Effect of Activators and Inhibitors on Lactase Activities to Determine its Kinetic Model. *Archives of Razi Institute*, 50, 93-98.
- [344] C.A. Hsu, R.C. Yu & C.C. Chou (2006). Purification and characterization of a sodium-stimulated  $\beta$ -galactosidase from *Bifidobacterium longum* CCRC 15708. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22 (4), 355-361.
- [345] T. Itoh, M. Suzuki & S. Adachi (1982). Production and characterization of  $\beta$ -galactosidase from lactose-fermenting yeasts. *Agricultural and Biological Chemistry*, 46 (4), 899-904.
- [346] H.S. Choonia & S.S. Lele (2013). Three phase partitioning of  $\beta$ -galactosidase produced by an indigenous *Lactobacillus acidophilus* isolate. *Separation and Purification Technology*, 110, 44-50.
- [347] M.E. Kreft & P. Jelen (2000). Stability and activity of  $\beta$ -galactosidase in sonicated cultures of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 11842 as affected by temperature and ionic environments. *Journal of Food Science*, 65 (8), 1364-1368.
- [348] F.I. Ustok, C. Tari & S. Harsa (2010). Biochemical and thermal properties of  $\beta$ -galactosidase enzymes produced by artisanal yoghurt cultures. *Food Chemistry*, 119 (3), 1114-1120.
- [349] G.X. Liu, J. Kong, W.W. Lu, W.T. Kong, H. Tian, X.Y. Tian & G.C. Huo (2011).  $\beta$ -Galactosidase with transgalactosylation activity from *Lactobacillus fermentum* K4. *Journal of Dairy Science*, 94 (12), 5811-5820.
- [350] H.R. Roberts & J.D. Pettinati (1957). Concentration effects in the enzymatic conversion of lactose to oligosaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 5 (2), 130-134.
- [351] M.H. López Leiva & M. Guzman (1995). Formation of oligosaccharides during enzymic hydrolysis of milk whey permeates. *Process Biochemistry*, 30 (8), 757-762.
- [352] P. Sen, C. Bhattacharjee & P. Bhattacharya (2016). Experimental studies and two-dimensional modelling of a packed bed bioreactor used for production of galacto-oligosaccharides (GOS) from milk whey. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 39 (3), 361-380.
- [353] A.A. Hugo, F. Bruno & M.A. Golowczyc (2016). Whey permeate containing galacto-oligosaccharides as a medium for biomass production and spray drying of *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114. *LWT - Food Science and Technology*, 69, 185-190.
- [354] M. Golowczyc, C. Vera, M. Santos, C. Guerrero, P. Carasi, A. Illanes, A. Gómez-Zavaglia & E. Tymczyszyn (2013). Use of whey permeate containing in situ synthesised galacto-oligosaccharides for the growth and preservation of *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Dairy Research*, 80 (3), 374-381.
- [355] C. Sabater, A. Olano, M. Prodanov, A. Montilla & N. Corzo (2017). An efficient process for obtaining prebiotic oligosaccharides derived from lactulose using isomerized and purified whey permeate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97, 5074-5082.
- [356] B. Padilla, F. Frau, A.I. Ruiz-Matute, A. Montilla, C. Belloch, P. Manzanares & N. Corzo (2015). Production of lactulose oligosaccharides by isomerisation of transgalactosylated cheese whey permeate obtained by  $\beta$ -galactosidases from dairy *Kluyveromyces*. *Journal of Dairy Research*, 82 (3), 356-364.
- [357] M. Adamczak, D. Charubin & W. Bednarski (2009). Influence of reaction medium composition on enzymatic synthesis of galactooligosaccharides and lactulose from lactose concentrates prepared from whey permeate. *Chemical Papers*, 63 (2), 111-116.
- [358] M.I. Foda & M. Lopez-Leiva (2000). Continuous production of oligosaccharides from whey using a membrane reactor. *Process Biochemistry*, 35 (6), 581-587.

- [359] B. Geiger, H.M. Nguyen, S. Wenig, et al. (2016). From by-product to valuable components: Efficient enzymatic conversion of lactose in whey using  $\beta$ -galactosidase from *Streptococcus thermophilus*. *Biochemical Engineering Journal*, 116, 45-53.
- [360] V. Sangwan, S.K. Tomar, B. Ali, R.R.B. Singh & A.K. Singh (2014). Production of  $\beta$ -galactosidase from *Streptococcus thermophilus* for galactooligosaccharides synthesis. *Journal of Food Science and Technology*, 52 (7), 4206-4215.
- [361] C.S. Chen, C.K. Hsu & B.H. Chiang (2002). Optimization of the enzymic process for manufacturing low-lactose milk containing oligosaccharides. *Process Biochemistry*, 38 (5), 801-808.
- [362] P.C. Lorenzen, J. Breiter, I. Clawin-Rädecker & A. Dau (2013). A novel bi-enzymatic system for lactose conversion. *International Journal of Food Science and Technology*, 48 (7), 1396-1403.
- [363] Y. Kobayashi, T. Kan & T. Terashima (1990). Method for producing processed milk containing galactooligosaccharide. Patent-Nr.: EP0323201B1.
- [364] A. Burvall, N.G. Asp & A. Dahlqvist (1979). Oligosaccharide formation during hydrolysis of lactose with *Saccharomyces lactis* lactase (Maxilact®): Part 1-Quantitative aspects. *Food Chemistry*, 4 (4), 243-250.
- [365] H. Yadav, S. Jain & P.R. Sinha (2007). Formation of oligosaccharides in skim milk fermented with mixed dahi cultures, *Lactococcus lactis* ssp *diacetylactis* and probiotic strains of lactobacilli. *Journal of Dairy Research*, 74 (2), 154-159.
- [366] X. Liu, J.H. Wu, Y. Gao, Y. Wu, L. Qian & Z. Wang (2015). Characterization of structure and cellular immunity bioactivity of milk-derived galactooligosacchrides prepared by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* fermentation. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 17 (6), 1481-1494.
- [367] N.A. Greenberg & R.R. Mahoney (1983). Formation of oligosaccharides by  $\beta$ -galactosidase from *Streptococcus thermophilus*. *Food Chemistry*, 10 (3), 195-204.
- [368] T. Maischberger, T.H. Nguyen, P. Sukyai, R. Kittl, S. Riva, R. Ludwig & D. Haltrich (2008). Production of lactose-free galacto-oligosaccharide mixtures: comparison of two cellobiose dehydrogenases for the selective oxidation of lactose to lactobionic acid. *Carbohydrate Research*, 343 (12), 2140-2147.

## 7 Anhang

### 7.1 Anhang zu Kapitel 2

**Tabelle A.7-1:** Überblick über die Molekülmasse einiger  $\beta$ -Galactosidasen, k. A. = keine Angabe.

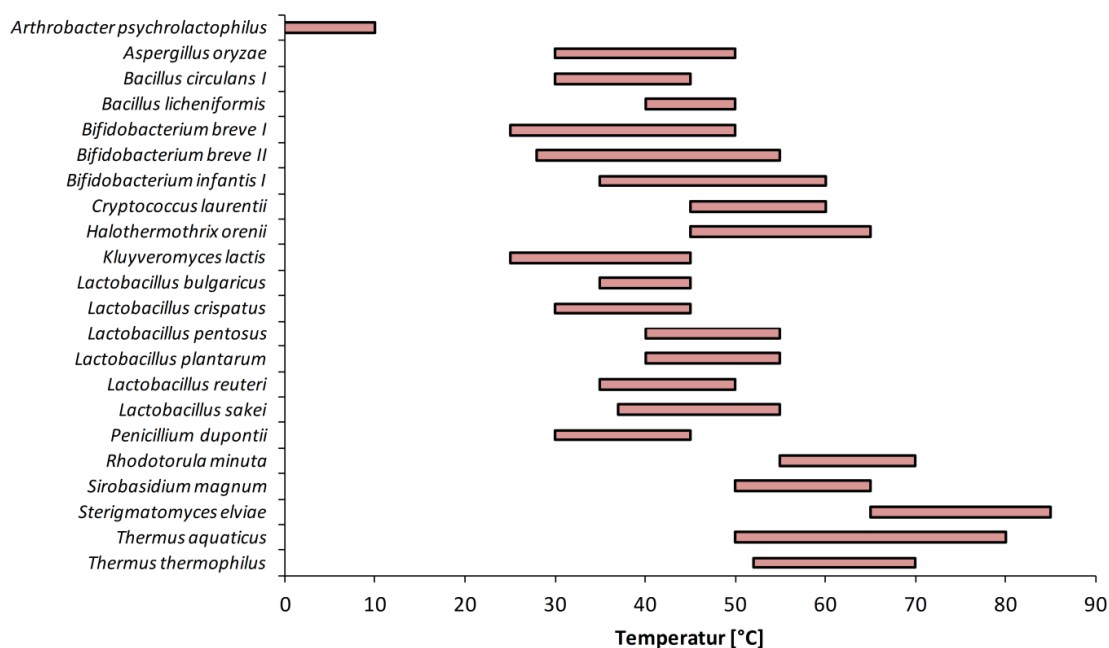
Enzymquelle <sup>a</sup>	Molekülmasse [kDa]	Anzahl der Untereinheiten	Bestimmungsmethode <sup>b</sup>	Ref.
<i>Aspergillus niger</i>	123-129	1	GPC, SDS-PAGE	[67]
<i>Penicillium dupontii</i>	49	1	GPC, SDS-PAGE	[336]
<i>Saccharopolyspora rectivirgula</i>	145	1	GPC, SDS-PAGE	[337]
<i>Thermotoga maritima</i>	120-130	1	SDS-PAGE, AS-Sequenz	[77]
<i>Bacillus licheniformis</i>	160	2	native PAGE, SDS-PAGE	[85]
<i>Cryptococcus laurentii</i>	200	2	GPC, SDS-PAGE	[65]
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	105	2 <sup>c</sup>	native PAGE, SDS-PAGE	[68]
<i>L. bulgaricus</i>	230	2	GPC, SDS-PAGE	[72]
<i>L. bulgaricus</i>	220	2	GPC, SDS-PAGE	[338]
<i>Lactobacillus reuteri</i>	105	2 <sup>c</sup>	native PAGE, SDS-PAGE	[66]
<i>Lactobacillus sakei</i>	110	2 <sup>c</sup>	native PAGE, SDS-PAGE	[69]
<i>Lactobacillus pentosus</i>	107	2 <sup>c</sup>	native PAGE, SDS-PAGE	[71]
<i>Lactobacillus plantarum</i>	107	2 <sup>c</sup>	native PAGE, SDS-PAGE	[70]
<i>Pediococcus acidilactici</i>	39	2 <sup>d</sup>	SDS-PAGE, MALDI-TOF	[339]
<i>Rhodotorula minuta</i>	144	2	GPC, SDS-PAGE	[141]
<i>Sirobasidium magnum</i>	135	2	GPC, SDS-PAGE	[79]
<i>Sterigmatomyces elviae</i>	170	2	GPC, SDS-PAGE	[140]
<i>A. psychrolactophilus</i>	548	4	native PAGE, SDS-PAGE	[74]
<i>Bifidobacterium infantis</i> I	470	4	native PAGE, SDS-PAGE	[83]
<i>Escherichia coli</i>	464	4	k. A.	[73]

<sup>a</sup> *L. bulgaricus* = *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *A. psychrolactophilus* = *Arthrobacter psychrolactophilus*.

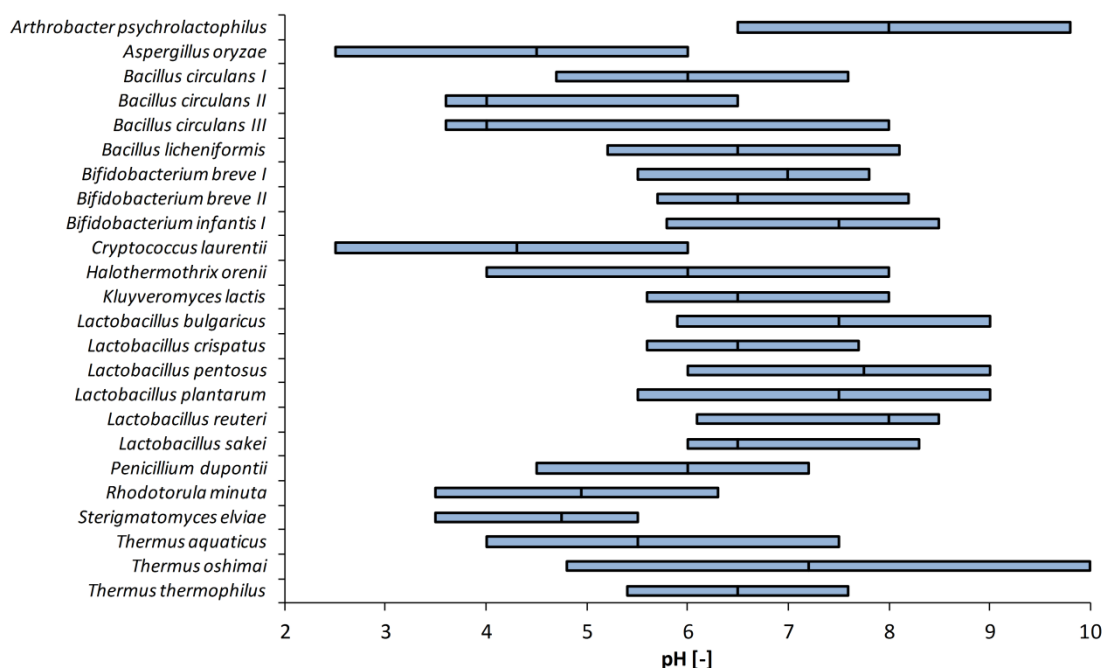
<sup>b</sup> GPC = Gelpermeationschromatographie, PAGE = Polyacrylamidgelelektrophorese, SDS = Natriumdodecylsulfat, AS = Aminosäure, MALDI-TOF = Matrix-Assistierte Laser-Desorption-Ionisierung (MALDI) mit Flugzeitanalyse (TOF, engl. *time of flight*).

<sup>c</sup> Heterodimer mit Untereinheiten der Größe 72 kDa und 35 kDa.

<sup>d</sup> Heterodimer mit Untereinheiten der Größe 15,55 kDa und 19,58 kDa.



**Abbildung A.7-1:** Temperaturwirkungsbereich verschiedener  $\beta$ -Galactosidasen. Untere Grenze: 50 % oNPG-Aktivität (Ausnahme *A. psychrolactophilus*: 80 %), obere Grenze: 100 % oNPG-Aktivität. Römische Ziffern I-III bezeichnen die jeweilige Isoform. Quellen: *A. psychrolactophilus* [74], *A. oryzae* [78], *B. circulans* [340], *B. licheniformis* [85], *B. breve* [81], *B. infantis* [83], *C. laurentii* [65], *H. orenii* [82], *K. lactis* [114], *L. bulgaricus* [72], *L. crispatus* [86], *L. pentosus* [71], *L. plantarum* [70], *L. reuteri* [66], *L. sakei* [69], *P. dupontii* [336], *R. minuta* [141], *S. elviae* [140], *T. aquaticus* [76], *T. oshimai* [341], *T. thermophilus* [75].



**Abbildung A.7-2:** pH-Wirkungsbereich verschiedener  $\beta$ -Galactosidasen. Untere und obere Grenze: 50 % oNPG-Aktivität. Senkrechter Strich: 100 % oNPG-Aktivität. Römische Ziffern I-III bezeichnen die jeweilige Isoform. Quellen: *A. psychrolactophilus* [74], *A. oryzae* [78], *B. circulans* [340], *B. licheniformis* [85], *B. breve* [81], *B. infantis* [83], *C. laurentii* [65], *H. orenii* [82], *K. lactis* [114], *L. bulgaricus* [72], *L. crispatus* [86], *L. pentosus* [71], *L. plantarum* [70], *L. reuteri* [66], *L. sakei* [69], *P. dupontii* [336], *R. minuta* [141], *S. elviae* [140], *T. aquaticus* [76], *T. oshimai* [341], *T. thermophilus* [75].

**Tabelle A.7-2:** Einfluss mono- und divalenter Kationen auf die  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität (+ = aktivierend, o = kein Einfluss (laut den jeweiligen Autoren bzw. relative Aktivität 95–105%, - = inhibierend, +/- und +/o = Einfluss ändert sich mit zunehmender Konzentration, n. b. = nicht bestimmt).

Enzymquelle <sup>a</sup>	Substrat	Puffer	pH	T [°C]	Na	K	Mg	Ca	Ref.
<i>Arthrobacter</i> sp.	oNPG	20 mmol/L Phosphat	8		+	+	+	o	[342]
<i>Aspergillus niger</i> <sup>b</sup>	Lactose	100 mmol/L Na-Acetat	4		n. b.	n. b.	o	o	[87]
<i>Aspergillus oryzae</i>	Lactose	100 mmol/L Citrat	4,8	30	o	+	+	n. b.	[343]
<i>Bacillus circulans</i>	Lactose	25 mmol/L Citronensäure-K-Phosphat	6,6		+	+	+	+	[3]
<i>Bacillus licheniformis</i>	oNPG	10 mmol/L Bis-Tris, 0,04 mmol/L EDTA	6,5	30	+	+	n. b.	n. b.	[85]
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	oNPG	50 mmol/L Na-Phosphat	7	65	n. b.	n. b.	+	n. b.	[93]
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Lactose	100 mmol/L Bis-Tris-Propan, Spuren von Mg	7	30	+	+	+	n. b.	[89]
<i>Bifidobacterium infantis</i>	oNPG	10 mmol/L Tris-HCl	7,5	60	+	+	n. b.	n. b.	[83]
<i>Bifidobacterium infantis</i>	oNPG	10 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L Na	7,5	60	n. b.	n. b.	+	+/-	[83]
<i>Bifidobacterium longum</i>	oNPG	30 mmol/L Na-Phosphat	6,8	37	+	+	-	-	[344]
<i>Candida pseudotropicalis</i> <sup>c</sup>	oNPG	100 mmol/L Phosphat	7	30	n. b.	n. b.	-	-	[345]
<i>Candida pseudotropicalis</i> <sup>c</sup>	oNPG	100 mmol/L Phosphat	7	30	n. b.	n. b.	-	-	[345]
<i>Cryptococcus laurentii</i>	oNPG	Mcllvaine	5,0	30	o	o	o	o	[65]
<i>Escherichia coli</i>	Lactose	25 mmol/L Citronensäure-K-Phosphat	6,6		-	+	+	-	[3]
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Lactose	20 mmol/L K-Phosphat	7,5	37	n. b.	+/-	+	n. b.	[95]
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Lactose	25 mmol/L Citronensäure-K-Phosphat	6,6		-	+	+	-	[3]
<i>Kluyveromyces lactis</i> <sup>d</sup>	Lactose	20 mmol/L Phosphat, 0,2 mmol/L Mn	6,6	37	+	+	n. b.	n. b.	[90]
<i>Kluyveromyces lactis</i>	oNPG	200 mmol/L K-Phosphat, 0,1 mmol/L EDTA, 0,1 mmol/L MgCl <sub>2</sub>	6,5	37	n. b.	+/-	+	n. b.	[95]
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Lactose	100 mmol/L Glycin-HCl	3	50	-	+	n. b.	-	[346]



Tabelle A.7-2 (Fortsetzung)

Enzymquelle <sup>a</sup>	Substrat	Puffer	pH	T [°C]	Na	K	Mg	Ca	Ref.
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	oNPG	10 mmol/L Bis-Tris	6,5	30	n. b.	n. b.	+	-	[68]
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	oNPG	100 mmol/L Phosphat	7	50	-	-	n. b.	n. b.	[346]
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Lactose	100 mmol/L Bis-Tris-Propan, Spuren von Mg	7	30	+	+	+	n. b.	[89]
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> <sup>e</sup>	Lactose	K-Phosphat	7	51	-	n. b.	n. b.	n. b.	[347]
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> <sup>c</sup>	oNPG	50 mmol/L Na-Phosphat	7	37	-	o	+	-	[348]
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	oNPG	10 mmol/L Bis-Tris	6,5	30	+	+	-	-	[72]
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	oNPG	50 mmol/L Na-Phosphat	6,5	30	n. b.	+	+	n. b.	[72]
<i>Lactobacillus casei</i>	Lactose	100 mmol/L Bis-Tris-Propan, Spuren von Mg	7	30	+	+	+	n. b.	[89]
<i>Lactobacillus crispatus</i> <sup>c</sup>	oNPG	50 mmol/L Na-Phosphat	6,5	45	o	+	o	-	[86]
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	oNPG	30 mmol/L Na-Phosphat	7	37	-	-	+	-	[156]
<i>Lactobacillus fermentum</i>	oNPG	wässrige Lösung			+	+	+	-	[349]
<i>Lactobacillus plantarum</i>	oNPG	50 mmol/L Na-Phosphat	6,5	30	+	+	+	n. b.	[70]
<i>Lactobacillus plantarum</i>	oNPG	10 mmol/L Na-Phosphat	6,5		+	+	+	o	[183]
<i>Lactobacillus reuteri</i>	oNPG	10 mmol/L Bis-Tris	6,5	30	+	+	n. b.	n. b.	[66]
<i>Lactobacillus reuteri</i>	oNPG	10 mmol/L Bis-Tris	6,5	30	+	+	n. b.	n. b.	[66]
<i>Lactobacillus reuteri</i>	oNPG	10 mmol/L Bis-Tris, 10 mmol/L Na	6,5	30	n. b.	+	+	-	[66]
<i>Lactobacillus reuteri</i>	oNPG	10 mmol/L Bis-Tris, 10 mmol/L Na	6,5	30	n. b.	+	+	-	[66]
<i>Lactobacillus reuteri</i>	oNPG	30 mmol/L Na-Phosphat	7	37	-	-	o	-	[156]
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Lactose	100 mmol/L Bis-Tris-Propan, Spuren von Mg	7	30	+	+	+	n. b.	[89]

**Tabelle A.7-2** (Fortsetzung)

Enzymquelle <sup>a</sup>	Substrat	Puffer	pH	T [°C]	Na	K	Mg	Ca	Ref.
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Lactose	100 mmol/L Bis-Tris-Propan-HCl	7	50	+	+	+	n. b.	[88]
<i>Streptococcus thermophilus</i> <sup>c</sup>	oNPG	50 mmol/L Na-Phosphat	7	37	-	o	+	-	[348]
<i>Streptococcus thermophilus</i>	oNPG	100 mmol/L Bis-Tris-Propan-HCl	7	50	+	+	+	n. b.	[88]
<i>Talaromyce thermophilus</i>	oNPG	50 mmol/L Phosphat	6,5	40	+	+	+/o	+/-	[336]
<i>Thermotoga maritima</i>	Lactose	50 mmol/L Maleinsäure/Tris/NaOH	6,5	80	n. b.	n. b.	+	o	[77]
<i>Thermotoga maritima</i>	oNPG	50 mmol/L Maleinsäure/Tris/NaOH	6,5	80	n. b.	n. b.	+	+	[77]
<i>Thermus oshimai</i>	oNPG	100 mmol/L Na-Phosphat	6,6	75	o	o	+/o	+/o	[341]
<i>Tolulopsis sphaerica</i> <sup>c</sup>	oNPG	100 mmol/L Phosphat	7	30	n. b.	n. b.	o	-	[345]
<i>Tolulopsis versatilis</i> <sup>c</sup>	oNPG	100 mmol/L Phosphat	7	30	n. b.	n. b.	-	-	[345]

<sup>a</sup> Sofern nicht anders angegeben, wurden die Werte mit aufgereinigten bzw. partiell aufgereinigten Enzymlösungen ermittelt.

<sup>b</sup> immobilisiertes Enzym (*tanned collagen-lactase membrane*).

<sup>c</sup> grober Enzymextrakt.

<sup>d</sup> ganze Zellen.

<sup>e</sup> ultraschallbehandelte Zellslösung.

Modifizierte Version publiziert als Tab. 1 in [CF4].

**Tabelle A.7-3:** Überblick über GOS-Synthesen in den Komplexmedien Molke, Milch und Permeat sowie Puffer zum Vergleich (sofern mind. 1 der genannten Substrate verwendet wurde), geordnet nach Medium und Enzymquelle, leere Felder = Daten im jeweiligen Paper nicht genannt.

Enzymquelle	Reinheit <sup>a</sup>	Betriebsweise <sup>b</sup>	Medium <sup>c</sup>	ILC <sup>d</sup> [% w/v]	E/S <sup>e</sup> [U/g]	T [°C]	pH	t <sup>f</sup> [h]	Y <sup>g</sup> [%]	Y <sup>g</sup> [g/L]	DH <sup>h</sup> [%]	Glc/Gal <sup>i</sup>	GOS/ reacLac <sup>j</sup>	GOS/ Gal	GOS – Zusammen- setzung <sup>k</sup>	Ref.
<i>Aspergillus niger</i>	E (P)	Batch	Puffer	30	2,7	50	4,5		14,5	44	45		0,3		DP3, DP4	[4]
<i>Aspergillus oryzae</i>	E (P)	Batch	Puffer	5		50	4,5		8,0	4	37		0,2		DP3	[4]
<i>Aspergillus oryzae</i>	E (P)	Batch	Puffer	21,2		30	4,5	1	21,0	45	45	1,9	0,5	2,3		[101]
<i>Aspergillus oryzae</i>	E (P)	Batch	Puffer	30		50	4,5		30,0	90	50		0,6		DP3, DP4	[4]
<i>Aspergillus oryzae</i>	E (P)	Batch	Puffer	40		40	4,5	1,5	23,0	92	51	2,2	0,5	2,7	DP3, DP4	[180]
<i>Aspergillus oryzae</i>	IE (P)	Batch	Puffer	40		40	4,5	4	26,0	104	67	1,2	0,4	1,4	DP3, DP4	[180]
<i>Aspergillus oryzae</i>	IE (P)	Batch	Puffer	40		40	4,5	1	31,0	124	44	5	0,7	15,5	DP3, DP4	[180]
<i>Aspergillus oryzae</i>	IE (P)	kont. (FBR)	Puffer	40		40	4,5	1	30,0	120	45		0,7		DP3, DP4	[180]
<i>Aspergillus oryzae</i>	E (P)	Batch	Puffer	44		30	4,5		26,3	116	54		0,5			[101]
<i>Bacillus circulans</i>	E (PP)	Batch	dest. Wasser	5	110	45	6		24,9	12	50		0,5		DP3, DP4, DP5, DP6	[147]
<i>Bacillus circulans</i>	IE (P)	Batch	Puffer	10		45	5,5		25,0	25	50		0,5		DP2, DP3, DP4	[178]
<i>Bacillus circulans</i>	IE (P)	kont. (FBR)	Puffer	10	1650	45	5,5	0,03	24,3	24	51,4		0,5		DP2, DP3, DP4	[178]
<i>Bacillus circulans</i>	E (P)	Batch	Puffer	10	0,1	60	6,6		55,0	55	69		0,8			[158]
<i>Bacillus circulans</i>	E (P)	Batch	Puffer	10	0,1	4	6,6	30	45,0	45						[158]

Tabelle A.7-3 (Fortsetzung)

Enzymquelle	Reinheit <sup>a</sup>	Betriebsweise <sup>b</sup>	Medium <sup>c</sup>	ILC <sup>d</sup> [% w/v]	E/S <sup>e</sup> [U/g]	T [°C]	pH	t <sup>f</sup> [h]	Y <sup>g</sup> [%]	Y <sup>g</sup> [g/L]	DH <sup>h</sup> [%]	Glc/Gal <sup>i</sup>	GOS/ reacLac <sup>j</sup>	GOS/ Gal	GOS – Zusammen- setzung <sup>k</sup>	Ref.
<i>Bacillus circulans</i>		Batch	Puffer	40	37,5	40	5,5	6,5	49,4	198	73,3	3,1	0,7	8,4	DP2, DP3, DP4	[173]
<i>Bacillus circulans</i>		Batch	Puffer	40	3,8	40	5,5	77,5	41,3	165	70,7	6,7	0,6	10,9	DP2, DP3, DP4	[173]
<i>Bacillus circulans</i>	E (PP)	Batch	dest. Wasser	40	13,8	45	6	4	40,2	161	59,5	5,1	0,7	12,8	DP3, DP4, DP5, DP6	[147]
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	WC	Batch	Puffer	50	17,2	40	6,2		40,1	210	84	1,7	0,5	2,7	> DP2	[133]
<i>Bullera singularis</i>	CE	Batch	Puffer	20	5,4		6	27	41,0	82	65		0,6		DP3, DP4, DP5	[177]
<i>Kluyveromyces fragilis</i>		Batch	Puffer	15		35	6,2	8	24,6	37	90,7	1,3	0,3			[350]
<i>Kluyveromyces fragilis</i>		Batch	Puffer	35		35	6,2	5	44,6	156	93,4	1,5	0,5			[350]
<i>Kluyveromyces lactis</i>	E (P)	Batch	Puffer	4,7	3	37	6,75	0,5	6,3	3						[170]
<i>Kluyveromyces lactis</i>	E (P)	Batch	Puffer	19,8	30	37	6,75	0,5	12,9	26	72,9		0,2			[324]
<i>Kluyveromyces lactis</i>	E (P)	kont. (MR)	Puffer	19,8	30	37	6,75	0,65	4,0	8	59,6	1,6	0,1	0,2		[324]
<i>Kluyveromyces lactis</i>	E (P)	Batch	Puffer	40	25	30	7	16	43,8	175,3	71,5		0,6			[176]
<i>Lactobacillus reuteri</i>	E (P)	Batch	Puffer	20,5	63,4	37	6		28,0	57	70	1,7	0,4		DP2, DP3, DP4	[96]
<i>Lactobacillus reuteri</i>	CE	Batch	Puffer	20,5	63,4	37	6		30,0	62	75	1,5	0,4		DP2, DP3, DP4	[96]
<i>Lactobacillus reuteri</i>	CE	Batch	Puffer	20,5	170,7	17	6		28,0	57	85	1,1	0,3	1,2	DP2, DP3, DP4	[96]
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	CE	Batch	Milchsaltze-Puffer	5	200	50	6,8	1	16,7	8	73	1,9	0,2	0,8	DP2, DP3, DP4	[134]

Tabelle A.7-3 (Fortsetzung)

Enzymquelle	Reinheit <sup>a</sup>	Betriebsweise <sup>b</sup>	Medium <sup>c</sup>	ILC <sup>d</sup> [% w/v]	E/S <sup>e</sup> [U/g]	T [°C]	pH	t <sup>f</sup> [h]	Y <sup>g</sup> [%]	Y <sup>g</sup> [g/L]	DH <sup>h</sup> [%]	Glc/Gal <sup>i</sup>	GOS/ reacLac <sup>j</sup>	GOS/ Gal	GOS – Zusammen- setzung <sup>k</sup>	Ref.
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	CE	Batch	Milchsaltze- Puffer	30	33,3	50	6,8	2	17,1	51	34,6	1,7	0,5	2,7	DP2, DP3, DP4	[134]
<i>Lactobacillus lactis</i>	CE	Batch	Milchsaltze- Puffer	5	200	50	6,8	1	13,7	7	39,8	2,1	0,3	1,6	DP2, DP3, DP4	[134]
<i>Lactobacillus lactis</i>	CE	Batch	Milchsaltze- Puffer	30	33,3	50	6,8	2	12,4	37	23,6	2,0	0,5	3,3	DP2, DP3, DP4	[134]
<i>Streptococcus thermophilus</i>	CE	Batch	Milchsaltze- Puffer	5	200	50	6,8	1	18,2	9	54,5	1,9	0,3	1,5	DP2, DP3, DP4	[134]
<i>Streptococcus thermophilus</i>	CE	Batch	Milchsaltze- Puffer	30	33,3	50	6,8	2	20,0	60	32,9	1,7	0,6	4,3	DP2, DP3, DP4	[134]
<i>Aspergillus oryzae</i>	E (P)	recycle- Batch (MR)	Sauermolken- permeat	13,4		25	4,3	1,92	16,1	22,5	30,8	2,2	0,5	3,5		[101]
<i>Aspergillus oryzae</i>	E (P)	recycle- Batch (MR)	Sauermolken- permeat	13,5		25	4,4	1,28	18,5	25	36,8	2,2	0,5	3,3		[101]
<i>Aspergillus oryzae</i>	E (P)	Batch	Sauermolken- permeat	14		30	4,45	0,75	20,5	29	44	2,5	0,5	3,4		[101]
<i>Aspergillus oryzae</i>	IE (P)	kont. (MR)	konz. entsalztes Molkenpermeat	20		40	4,5	0,004	14,0	28	43		0,3		DP3	[351]
<i>Aspergillus oryzae</i>	E (P)	recycle- Batch	konz. entsalztes Molkenpermeat	35		30- 40		3	22,0	77	60		0,4			[101]
<i>Aspergillus oryzae</i>	E (P)	Batch	konz. entsalztes Molkenpermeat	38,6		37	4,45	1,33	26,1	100					DP2, DP3, DP4, DP5	[101]
<i>Aspergillus oryzae</i>	E (P)	Batch	suppl. konz. ents. Molkenpermeat	53,3		50		1,17	27,0	144						[101]
<i>Bacillus circulans</i>	E (P)	Batch	konz. entprot. Caseinmolke	20		35	6,5	1	43,5	87	50		0,9		DP3	[161]
<i>Bacillus circulans</i>	IE (P)	kont. (FBR)	konz. entprot. Caseinmolke	20		35	6,5	0,49	20,0	40	37		0,5		DP3	[161]
<i>Bacillus circulans</i>	IE (P)	kont. (FBR)	konz. entprot. Caseinmolke	20		35	6,5	2,02	24,4	49	35		0,7		DP3	[352]

Tabelle A.7-3 (Fortsetzung)

Enzymquelle	Reinheit <sup>a</sup>	Betriebsweise <sup>b</sup>	Medium <sup>c</sup>	ILC <sup>d</sup> [% w/v]	E/S <sup>e</sup> [U/g]	T [°C]	pH	t <sup>f</sup> [h]	y <sup>g</sup> [%]	y <sup>g</sup> [g/L]	DH <sup>h</sup> [%]	Glc/Gal <sup>i</sup>	GOS/ reacLac <sup>j</sup>	GOS/ Gal	GOS – Zusammen- setzung <sup>k</sup>	Ref.
<i>Kluyveromyces fragilis</i>		Batch	konz. entprot. Caseinmolke	13,8		35		5	36,2	50						[350]
<i>Kluyveromyces fragilis</i>		Batch	konz. entprot. Caseinmolke	35,5		35		7	43,6	155						[350]
<i>Aspergillus niger</i>	E (P)	Batch	Sauermolke	4		55	4,5	5	1,5	0,6						[179]
<i>Aspergillus oryzae</i>	IE (P)	kont. (FBR)	konz. Sauermolke (HCl)	20		40	4,5		21,0	42	75		0,3		DP3, DP4, DP5	[180]
<i>Aspergillus oryzae</i>	IE (P)	Batch	Molkenpermeat	3,7		50	4,5		8,0	3	40	1,1	0,2	0,9	DP3	[4]
<i>Aspergillus oryzae</i>	IE (P)	kont. (MR)	Molkenpermeat	3,7		50	4,5		4,0	1	60		0,1		DP3	[4]
<i>Aspergillus oryzae</i>	E (P)	Batch	konz. Molkenpermeat	14		35	5	2	17,9	25	48,4		0,4			[172]
<i>Aspergillus oryzae</i>	E (P)	Batch	konz. Süß- molkenpermeat	37,6	100	37	4,5	1	27,4	103						[353]
<i>Aspergillus oryzae</i>	E (P)	Batch	konz. Süß- molkenpermeat	37,6	100	37	4,5	1,75	27,3	103	57	3,1	0,5	3,4	DP3, DP4, DP5	[354]
<i>Bacillus circulans</i>	E (P)	Batch	konz. Süß- molkenpermeat	25	2,8	50	6,5	5	52,4	131	90	5,0	0,6	10,5	DP2, DP3, DP4	[355]
<i>Bacillus circulans</i>	E (PP)	Batch	konz. Molkenpermeat	40	13,8	45		6	36,0	144	50		0,7		DP3, DP4, DP5	[147]
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	WC	Batch	konz. Süß- molkenpermeat	50	17,2	40	5,4		37,8	189	86	1,6	0,4	2,1	> DP2	[133]
<i>Bullera singularis</i>	CE	Batch	konz. Süß- molkenpermeat	20	5,4		6	27	34,0	68	61		0,6		DP3, DP4, DP5	[177]
<i>Escherichia coli</i>	E (P)	Batch	konz. ents. Molkenpermeat in Puffer	20		37	7	3	20,5	41	60	1,6	0,3	1,0		[166]

Tabelle A.7-3 (Fortsetzung)

Enzymquelle	Reinheit <sup>a</sup>	Betriebsweise <sup>b</sup>	Medium <sup>c</sup>	ILC <sup>d</sup> [% w/v]	E/S <sup>e</sup> [U/g]	T [°C]	pH	t <sup>f</sup> [h]	Y <sup>g</sup> [%]	Y <sup>g</sup> [g/L]	DH <sup>h</sup> [%]	Glc/Gal <sup>i</sup>	GOS/ reacLac <sup>j</sup>	GOS/ Gal	GOS – Zusammen- setzung <sup>k</sup>	Ref.
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	E (P)	Batch	konz. Molken- permeat	23		35	7	3,5	23,5	54	69,5		0,3			[172]
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	CE	Batch	konz. Süß- molkenpermeat	25	2,4	50	6,5	4	30,3	76	93,9	1,4	0,3	1,2	DP2, DP3	[356]
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	E (P)	Batch	konz. Süß- molkenpermeat	30	40	40	6,5		11,5	35					DP2, DP3, DP4, DP5	[357]
<i>Kluyveromyces lactis</i>	E (P)	Batch	Süßmolken- permeat	3,9	38	37	6,75	1,5	9,2	4						[170]
<i>Kluyveromyces lactis</i>	E (P)	Batch	konz. Süß- molkenpermeat	10	40	40	6,5	0,17	13,7	14	43		0,3		DP2, DP3, DP4, DP5	[357]
<i>Kluyveromyces lactis</i>	E (P)	Batch	konz. ents. Molkenpermeat in Puffer	19,8		40	6,8	1	18,0	38	62	1,4	0,3	0,8		[166]
<i>Kluyveromyces lactis</i>	E (P)	kont. (MR)	konz. Molken- permeat	20		45	7	4	31,0	62	87		0,4		DP3, DP4	[358]
<i>Kluyveromyces lactis</i>	E (P)	Batch	konz. ents. Molkenpermeat in Puffer	20		37	7	3,5	20,5	41	75	1,2	0,3	0,7		[166]
<i>Kluyveromyces lactis</i>	E (P)	kont. (MR)	konz. Süß- molkenpermeat	20,1	30	37	6,75	0,75	8,0	16	40,2	2,3	0,2	0,8		[324]
<i>Kluyveromyces lactis</i>	E (P)	Batch	konz. Süß- molkepermeat	20,3	30	37	6,75	1	16,2	33	53,7		0,3			[324]
<i>Kluyveromyces lactis</i>	E (P)	Batch	konz. Molken- permeat	23		45	7	4,5	22,2	51	71,7		0,3		DP3, DP4	[358]
<i>Kluyveromyces lactis</i>	E (P)	kont. (MR)	konz. Molken- permeat	23		45	7	4	19,6	45	70		0,3		DP3, DP4	[358]
<i>Kluyveromyces lactis</i>	E (P)	Batch	konz. Molken- permeat	23		45	7	4,5	22,2	51	72,1		0,3			[172]
<i>Kluyveromyces lactis</i>	CE	Batch	konz. Süß- molkenpermeat	25	2,4	50	6,5	4	31,3	78	87,3	1,5	0,4	1,4	DP2, DP3	[356]



Tabelle A.7-3 (Fortsetzung)

Enzymquelle	Reinheit <sup>a</sup>	Betriebsweise <sup>b</sup>	Medium <sup>c</sup>	ILC <sup>d</sup> [% w/v]	E/S <sup>e</sup> [U/g]	T [°C]	pH	t <sup>f</sup> [h]	Y <sup>g</sup> [%]	Y <sup>g</sup> [g/L]	DH <sup>h</sup> [%]	Glc/Gal <sup>i</sup>	GOS/ reacLac <sup>j</sup>	GOS/ Gal	GOS – Zusammen- setzung <sup>k</sup>	Ref.
<i>Kluyveromyces lactis</i>	CE	Batch	konz. Süßmolkenpermeat	25	2,4	50	6,5	4	33,2	83	87,6	1,5	0,4	1,5	DP2, DP3	[356]
<i>Kluyveromyces lactis</i>	E (P)	Batch	konz. Süßmolkenpermeat	30	40	40	6,5		8,0	24					DP2, DP3, DP4, DP5	[357]
<i>Kluyveromyces lactis</i>	E (P)	Batch	konz. Süßmolkenpermeat	30	40	40	6,5		8,0	24					DP2, DP3, DP4	[357]
<i>Kluyveromyces lactis</i>	E (P)	Batch	konz. ents. Molkenpermeat in Puffer	34,3		40	6,8	3,5	23,2	80	62,7	1,9	0,4	1,2		[166]
<i>Lactobacillus reuteri</i>	CE	Batch	konz. Molkenpermeat	19,4	92,8	17	5,8		25,0	49	85		0,3	1,0	DP2, DP3, DP4	[96]
<i>Streptococcus thermophilus</i>	rek. E (CE)	Batch	Süßmolkenpermeat + Mg	5	250	37	6,5	2	34,2	17	79,7		0,4		DP2, DP3	[359]
<i>Streptococcus thermophilus</i>	E (CE)	Batch	suppl. entprot. Süßmolke	5	200	40	6,8	5	0,0	0						[360]
<i>Streptococcus thermophilus</i>	rek. E (CE)	Batch	konz. Süßmolkenpermeat + Mg	20,5	121,9	50	6,5	5	50,0	103	90		0,6		DP2, DP3	[359]
<i>Streptococcus thermophilus</i>	E (CE)	Batch	suppl. entprot. Süßmolke	35	28,6	40	6,8	5	16,4	57						[360]
<i>Kluyveromyces lactis</i>	E (P)	Batch	Süßmolke	4,7	32	37	6,75	1	6,7	3						[170]
<i>Kluyveromyces lactis</i>	E (P)	kont. (MR)	konz. Süßmolke	19,7	30	37	6,75	2,12	10,7	21	54,3	1,9	0,2	0,5		[324]
<i>Kluyveromyces lactis</i>	E (P)	Batch	konz. Süßmolke	20	30	37	6,75	1	15,6	31	59,2		0,3			[324]
<i>Kluyveromyces lactis</i>	E (P)	Batch	konz. Süßmolke in Puffer	40	0,2	40	7	4	29,9	120	68,7	3,3	0,4	3,3		[143]
<i>Lactobacillus paracasei</i>	CE	Batch	konz. Süßmolke	28,1		30		4	17,0	48	50		0,3		DP2, DP3, DP4	[165]



Tabelle A.7-3 (Fortsetzung)

Enzymquelle	Reinheit <sup>a</sup>	Betriebsweise <sup>b</sup>	Medium <sup>c</sup>	ILC <sup>d</sup> [% w/v]	E/S <sup>e</sup> [U/g]	T [°C]	pH	t <sup>f</sup> [h]	y <sup>g</sup> [%]	y <sup>g</sup> [g/L]	DH <sup>h</sup> [%]	Glc/Gal <sup>i</sup>	GOS/ reacLac <sup>i</sup>	GOS/ Gal	GOS – Zusammen- setzung <sup>k</sup>	Ref.
<i>Kluyveromyces lactis</i>	E (P)	Batch	konz. Buttermilch (41,7 % TVM)	21,9		43		0,5	14,5	32	63		0,2			[171]
<i>Kluyveromyces lactis</i>	E (P)	Batch	Buttermilch & Molkenpermeat (85:15 v/v)	24,1		38		1,33	12,9	31	58,5	1,9	0,2	1,1		[171]
<i>Aspergillus aculeatus</i>	E (P)	Batch	suppl. UF-Magermilchpermeat	42,8	30	60	6,5	7	13,0	56	24	3,5	0,4	4,3	DP2, DP3, DP4	[130]
<i>Aspergillus oryzae</i>	E (P)	Batch	konz. UF-Permeat	16,7		47		3,1	27,9	47	58,9		0,5		DP3, DP4, DP5	[361]
<i>Aspergillus oryzae</i>	E (P)	Batch	konz. UF-Permeat	25,3		50		3,5	31,1	79	64,7		0,5		DP3, DP4, DP5	[361]
<i>Aspergillus oryzae</i>	Batch	Batch	suppl. Magermilchpermeat	38,4	12	40	4,5	4	20,5	79	33,1	10,3	0,6	10,3	DP2, DP3, DP4	[151]
<i>Aspergillus oryzae</i>	E (P)	Batch	suppl. UF-Magermilchpermeat	41,2	12	40	4,5	7	21,0	87	41	3,6	0,5	5,3	DP2, DP3, DP4	[130]
<i>Bacillus circulans</i>	E (P)	Batch	suppl. UF-Magermilchpermeat	39	12	40	7	5	41,0	160	49	14,5	0,7	41,0	DP2, DP3, DP4, DP5	[130]
<i>Bacillus circulans</i>	Batch	Batch	suppl. Magermilchpermeat	40	12	40	4	5	41,0	164	55,2		0,7		DP2, DP3, DP4, DP5	[151]
<i>Kluyveromyces lactis</i>	E (P)	Batch	konz. Magermilchpermeat + Mg	41	300	37	6,7	3	53,4	219	93	n. k. <sup>i</sup>	0,6		DP2, DP3	[362]
<i>Kluyveromyces lactis</i>	E (P)	Batch	suppl. UF-Magermilchpermeat	41,1	12	40	7,5	7	11,0	45	51	1,7	0,2	0,7	DP2, DP3, DP4	[130]
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Batch	Batch	suppl. Magermilchpermeat	44,2	12	40	7	5	34,9	154	82,2	2,0	0,4	2,0	DP2, DP3, DP4	[151]
<i>Aspergillus oryzae</i>	E (P)	Batch	Ziegenmilch	4,5	224,2	40	6,63	0,33	13,2	6	35,4		0,4			[167]

Tabelle A.7-3 (Fortsetzung)

Enzymquelle	Reinheit <sup>a</sup>	Betriebsweise <sup>b</sup>	Medium <sup>c</sup>	ILC <sup>d</sup> [% w/v]	E/S <sup>e</sup> [U/g]	T [°C]	pH	t <sup>f</sup> [h]	Y <sup>g</sup> [%]	Y <sup>g</sup> [g/L]	DH <sup>h</sup> [%]	Glc/Gal <sup>i</sup>	GOS/ reacLac <sup>j</sup>	GOS/ Gal	GOS – Zusammen- setzung <sup>k</sup>	Ref.
<i>Aspergillus oryzae</i>	E (P)	Batch	Magermilch	4,6	2	40	6,7	1,5	9,8	5	43	1,8	0,2	0,8	DP2, DP3	[20]
<i>Aspergillus oryzae</i>	E (P)	Batch	Magermilch	4,5	10	40		6	18,9	8,5	56,7		0,3		> DP2	[363]
<i>Aspergillus oryzae</i>	E (P)	Batch	konz. Magermilch	12,1		50		0,5	20,5	25	44,3	2,3	0,5	2,8	DP3, DP4, DP5	[361]
<i>Aspergillus oryzae</i>	E (P)	Batch	konz. Magermilch	16,7		47		1,4	22,8	38	65,3		0,3		DP3, DP4, DP5	[361]
<i>Bacillus circulans</i>	E (P)	Batch	Magermilch	4,6	21,9	30	6,6		5,5	3	39		0,1		DP3	[3]
<i>Bacillus circulans</i>	E (P)	Batch	Magermilch	4,6	12,3	4	6,7	2,5	17,6	8	45,4	1,8	0,4	1,8	DP2, DP3, DP4	[20]
<i>Bacillus circulans</i>		Batch	Magermilch	4,6	32,6	40	6,7	2	15,4	7	52	1,8	0,3	1,2	DP2, DP3, DP4	[173]
<i>Bacillus circulans</i>	IE (P)	kont. (FBR)	Milch	4,8	3438	4			14,4	7	34		0,4		DP2, DP3, DP4	[178]
<i>Bacillus circulans</i>	IE (P)	kont. (MR)	Magermilch	5		20		0,05	13,0	7	35		0,4		DP3	[159]
<i>Bacillus circulans</i>	E (P)	Batch	Magermilch	5,4	0,1	60	6,7		46,0	25	52		0,9			[158]
<i>Bacillus circulans</i>	E (P)	Batch	Magermilch	5,4	0,1	4	6,7	30	28,0	15						[158]
<i>Bacillus circulans</i>	E (P)	Batch	konz. Magermilch	12	41,7	30	6,6		14,0	17	33		0,4		DP3	[3]
<i>Bifidobacterium infantis</i>	IZ	Batch	suppl. Magermilch	35		60		8	43,0	151						[144]
<i>Escherichia coli</i>	E (P)	Batch	Magermilch	4,6	65,8	30	6,6		21,0	10	80		0,3			[3]
<i>Escherichia coli</i>	E (P)	Batch	konz. Magermilch	12	58,3	30	6,6		38,0	46	75		0,5			[3]

Tabelle A.7-3 (Fortsetzung)

Enzymquelle	Reinheit <sup>a</sup>	Betriebsweise <sup>b</sup>	Medium <sup>c</sup>	ILC <sup>d</sup> [% w/v]	E/S <sup>e</sup> [U/g]	T [°C]	pH	t <sup>f</sup> [h]	Y <sup>g</sup> [%]	Y <sup>g</sup> [g/L]	DH <sup>h</sup> [%]	Glc/Gal <sup>i</sup>	GOS/ reacLac <sup>j</sup>	GOS/ Gal	GOS – Zusammen- setzung <sup>k</sup>	Ref.
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	E (P)	Batch	Ziegenmilch	4,1		45	7	4,5	26,7	11						[169]
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	E (P)	Batch	Magermilch	4,5	10	40		6	23,1	10,4	93,1				> DP2	[363]
<i>Kluyveromyces lactis</i>	E (P)	Batch	Magermilch	4,6	65,8	25	6,6		14,0	6	90		0,2			[3]
<i>Kluyveromyces lactis</i>	E (P)	Batch	Magermilch	4,6	29,3	40	6,7	1	15,2	7	95	1,2	0,2	0,4	DP2, DP3	[20]
<i>Kluyveromyces lactis</i>	E (P)	Batch	Magermilch	5		24		24	5,0	3	70		0,1		DP3, DP4	[364]
<i>Kluyveromyces lactis</i>	E (P)	Batch	UHT-Milch	4,4	6,8	30	6,6	5	20,5	9	95,27		0,2		DP2, DP3,...	[230]
<i>Kluyveromyces lactis</i>	E (P)	Batch	konz. Magermilch	12	58,3	25	6,6		23,0	28	90		0,3			[3]
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	IZ	Batch	suppl. Büffel- magermilch	7		37	6,67	14	20,3	14	60,0	n. k. <sup>l</sup>	0,3		DP3, DP4, DP5	[365]
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	CE	Batch	Magermilch	5	200	50		2	10,1	5	72,2	1,7	0,1	0,4	DP2, DP3	[134]
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	IZ	Batch	Magermilch			37		8		12,4					DP2, DP3, DP4	[366]
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>		Batch	Magermilch	4,5	10	40		6	36,9	16,6	90,9		0,4		> DP2	[363]
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	CE	Batch	konz. Magermilch	15	66,7	50		2	12,5	19	42,4	1,6	0,3	1,1	DP2, DP3	[134]
<i>Lactobacillus casei</i>	IZ	Batch	suppl. Büffel- magermilch	7		37	6,67	14	14,9	10	42,9	n. k. <sup>l</sup>	0,3		DP3, DP4, DP5	[365]
<i>Lactobacillus lactis</i>	CE	Batch	Magermilch	5	200	50		2	12,0	6	56,2	1,6	0,2	0,7	DP2, DP3, DP4	[134]
<i>Lactobacillus lactis</i>	CE	Batch	konz. Magermilch	15	66,7	50		2	9,7	15	23,5	1,9	0,4	2,0	DP2, DP3, DP4	[134]

Tabelle A.7-3 (Fortsetzung)

Enzymquelle	Reinheit <sup>a</sup>	Betriebsweise <sup>b</sup>	Medium <sup>c</sup>	ILC <sup>d</sup> [% w/v]	E/S <sup>e</sup> [U/g]	T [°C]	pH	t <sup>f</sup> [h]	Y <sup>g</sup> [%]	Y <sup>g</sup> [g/L]	DH <sup>h</sup> [%]	Glc/Gal <sup>i</sup>	GOS/ reacLac <sup>j</sup>	GOS/ Gal	GOS – Zusammen- setzung <sup>k</sup>	Ref.
<i>Lactococcus lactis ssp diacetylactis</i>	IZ	Batch	suppl. Büffel- magermilch	7		30	6,67	14	12,0	8	42,9	n. k. <sup>l</sup>	0,3		DP3, DP4, DP5	[365]
<i>Streptococcus thermophilus</i>	E (PP)	Batch	Magermilch	5		37		1	24,8	12	93,8	1,9	0,3	1,2	DP2	[367]
<i>Streptococcus thermophilus</i>	CE	Batch	Magermilch	5	200	50		2	13,0	6	61,4	1,9	0,2	0,8	DP2, DP3	[134]
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Batch	Batch	Magermilch	4,5	10	40		6	45,1	20,3	90		0,5		> DP2	[363]
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Batch	Batch	Magermilch	5,2	30	40		3	38,4	20	92,6		0,4		DP2, DP3, DP4	[363]
<i>Streptococcus thermophilus</i>	CE	Batch	konz. Magermilch	15	66,7	50		2	16,5	25	30,5	2,1	0,5	3,7	DP2, DP3	[134]
<i>mixed dahi culture</i>	IZ	Batch	suppl. Büffel- magermilch	7		30	6,67	14	12,9	9	52,9	n. k. <sup>l</sup>	0,2		DP3, DP4, DP5	[365]

<sup>a</sup> E = Enzym, IE = immobilisiertes Enzym, rek. E = rekombinant hergestelltes Enzym, P = aufgereinigt (engl. *purified*), PP = partiell aufgereinigt (engl. *partially purified*), CE = grober Zellextrakt (engl. *crude extract*), IZ = lebende Zellen.

<sup>b</sup> kont. = kontinuierlicher Prozess, FBR = Festbettreaktor, MR = Membranreaktor; Angaben bei kontinuierlichen Prozessen aus dem stationären Zustand.

<sup>c</sup> konz. = konzentriert, suppl. = mit Lactose supplementiert, entprot. = entproteiniert, ents. = entsalzt.

<sup>d</sup> ILC = Anfangslactosekonzentration (engl. *initial lactose concentration*).

<sup>e</sup> E/S = Enzym/Substrat-Verhältnis.

<sup>f</sup> t = Reaktionszeit bis zur maximalen GOS-Ausbeute.

<sup>g</sup> Y = maximale GOS-Ausbeute.

<sup>h</sup> DH = Lactosehydrolysegrad zum Zeitpunkt maximaler GOS-Ausbeute.

<sup>i</sup> Glc/Gal = Glucose/Galactose-Faktor zum Zeitpunkt maximaler GOS-Ausbeute.

<sup>j</sup> GOS/reacLac = GOS-zu-umgesetzte Lactose-Verhältnis zum Zeitpunkt maximaler GOS-Ausbeute = Y[%]/DH[%].

<sup>k</sup> DP = Polymerisationsgrad (Kettenlänge).

<sup>l</sup> n. k. = nicht kalkulierbar, da Glucose und/oder Galactose während der Reaktion verbraucht werden.

Modifizierte Version publiziert als Tab. 2 in [CF3].

**Tabelle A.7-4:** Übersicht über GOS-Ausbeute (% des Gesamtzuckers) und -Zusammensetzung (% der Gesamt-GOS, auf ganze Zahlen gerundet, daher Abw. von 100 % mgL) mit verschiedenen *Lactobacillus*-Stämmen sortiert nach Reaktionsmedium (Puffer, Milch, Molke) und Anfangslactosekonzentration (ILC), freie Felder = keine Angabe.

Enzymeigenschaften			Reaktionsparameter					DH <sup>f</sup>		% des Gesamtzuckers				Transgalactolytische Aktivität				% der Gesamt-GOS <sup>g</sup>					Ref.
Enzymquelle	Stamm	Reinheit <sup>a</sup>	Medium <sup>b</sup>	ILC <sup>c</sup> [%]	E/S <sup>d</sup> [U/g]	T [°C]	pH	t <sup>e</sup> [h]	[%]	GOS	Glc	Gal	Glc/Gal	GOS/reac.Lac	GOS/Gal	DP2	DP3	DP4	DP5				
<i>Lactobacillus reuteri</i>	L103	E (P)	50 mmol/L Na-Phosphat-Puffer + 1 mM MgCl <sub>2</sub>	4,6		30	6,5		79	18				0,2						[182]			
<i>Lactobacillus reuteri</i>	L103	E (P)	50 mmol/L Na-Phosphat-Puffer + 1 mmol/L MgCl <sub>2</sub>	4,6	K	37	6		50	10				0,2		X	X	X		[129]			
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	ATCC 4356	CE	100 mmol/L Na-Phosphat-Puffer	5		50	6,8	3		20						X	X	X		[155]			
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	11842	CE - MF	Milchsalze-Puffer	5	200	50	6,8	1	73	16,7	37	20	1,9	0,2	0,8	43	45	12		[134]			
<i>Lactobacillus lactis</i>	DMF 3078	CE - MF	Milchsalze-Puffer	5	200	50	6,8	1	40	13,7	18	9	2,1	0,3	1,6	58	34	8		[134]			
<i>Lactobacillus reuteri</i>	L103	E (P)	50 mmol/L Na-Phosphat-Puffer + 1 mmol/L MgCl <sub>2</sub>	10,3		30	6,5		78	26				0,3						[182]			
<i>Lactobacillus reuteri</i>	L103	E (P)	50 mmol/L Na-Phosphat-Puffer + 1 mmol/L MgCl <sub>2</sub>	10,3	K	37	6		50	19				0,4		X	X	X		[129]			
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	11842	CE - MF	Milchsalze-Puffer	12,5	80	50	6,8		49	16,0	20	13	1,6	0,3	1,3	44	50	6		[134]			
<i>Lactobacillus lactis</i>	DMF 3078	CE - MF	Milchsalze-Puffer	12,5	80	50	6,8		31	11,6	12	8	1,5	0,4	1,5	55	41	4		[134]			
<i>L. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i>	LS-8	US-Zellen	50 mmol/L Na-Phosphat-Puffer	20		37	6,5		20,1											[183]			
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	11842	CE - MF	Milchsalze-Puffer	20	50	50	6,8		40	16,2	15	9	1,7	0,4	1,8	45	52	3		[134]			
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	WG1-2	US-Zellen	50 mmol/L Na-Phosphat-Puffer	20		37	6,5		30,3											[183]			

Tabelle A.7-4 (Fortsetzung)

Enzymeigenschaften			Reaktionsparameter					DH <sup>f</sup>		% des Gesamtzuckers			Transgalactolytische Aktivität			% der Gesamt-GOS <sup>g</sup>					Ref.
Enzymquelle	Stamm	Reinheit <sup>a</sup>	Medium <sup>b</sup>	ILC <sup>c</sup> [%]	E/S <sup>d</sup> [U/g]	T [°C]	pH	t <sup>e</sup> [h]	[%]	GOS	Glc	Gal	Glc/Gal	GOS/ reac.Lac	GOS/ Gal	DP2	DP3	DP4	DP5		
<i>Lactobacillus helveticus</i>	MB2-1	US-Zellen	50 mmol/L Na-Phosphat-Puffer	20		37	6,5			18,9										[183]	
<i>Lactobacillus lactis</i>	DMF 3078	CE - MF	Milchsalze-Puffer	20	50	50	6,8		25	10,3	9	5	1,6	0,4	1,9	59	37	4		[134]	
<i>Lactobacillus plantarum</i>	70810	US-Zellen	50 mmol/L Na-Phosphat-Puffer	20		37	6,5			39,2						X	X			[183]	
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	6005	US-Zellen	50 mmol/L Na-Phosphat-Puffer	20		37	6,5			22,2										[183]	
<i>Lactobacillus sakei</i>	GL2-1	US-Zellen	50 mmol/L Na-Phosphat-Puffer	20		37	6,5			17,1										[183]	
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	R22	E (P)	50 mmol/L Na-Phosphat-Puffer + 1 mmol/L MgCl <sub>2</sub>	20,5	4,9	30	6,5		75	38,5				0,5		40	49	10		[68]	
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	DSM 20081	E (P)	50 mmol/L Na-Phosphat-Puffer + 1 mmol/L MgCl <sub>2</sub>	20,5	7,3	30	6,5		90	50			2,4	0,6						[291]	
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	DSM 20081 (11842)	rek. L. <i>plantarum</i> (P)	50 mmol/L Na-Phosphat-Puffer + 10 mmol/L MgCl <sub>2</sub>	20,5	7,3	30	6,5	12	90,1	49,7	28,7	11,9	2,4	0,6	4,2	X	X			[72]	
<i>Lactobacillus pentosus</i>	KUB-ST10-1	E (P)	50 mmol/L Na-Phosphat-Puffer + 2 mmol/L MgCl <sub>2</sub>	20,5	24,4	30	6,5		78,1	30,7	31,5	15,9	2,0	0,4	1,9	37	61	2		[71]	
<i>Lactobacillus plantarum</i>	WCFS 1	rek. L. <i>plantarum</i> (P)	50 mmol/L Na-Phosphat-Puffer + 1 mmol/L MgCl <sub>2</sub>	20,5	4,9	37	6,5	8	85	41	31	15	2,1	0,5	2,7	46	51	3		[70]	
<i>Lactobacillus reuteri</i>	L103	E (P)	50 mmol/L Na-Phosphat-Puffer + 1 mmol/L MgCl <sub>2</sub>	20,5	3,9	30	6,5		78	35			1,7	0,4						[291]	

Tabelle A.7-4 (Fortsetzung)

Enzymeigenschaften			Reaktionsparameter					DH <sup>f</sup>		% des Gesamtzuckers			Transgalactolytische Aktivität			% der Gesamt-GOS <sup>g</sup>					Ref.
Enzymquelle	Stamm	Reinheit <sup>a</sup>	Medium <sup>b</sup>	ILC <sup>c</sup> [%]	E/S <sup>d</sup> [U/g]	T [°C]	pH	t <sup>e</sup> [h]	[%]	GOS	Glc	Gal	Glc/Gal	GOS/reac.Lac	GOS/Gal	DP2	DP3	DP4	DP5		
<i>Lactobacillus reuteri</i>	L103	E (P)	50 mmol/L Na-Phosphat-Puffer + 1 mmol/L MgCl <sub>2</sub>	20,5	63,4	37	6		70	28			1,7	0,4			X	X	X	[96]	
<i>Lactobacillus reuteri</i>	L103	CE - H+Z	50 mmol/L Na-Phosphat-Puffer + 1 mmol/L MgCl <sub>2</sub>	20,5	63,4	37	6		75	30			1,5	0,4			X	X	X	[96]	
<i>Lactobacillus reuteri</i>	L103	CE - H+Z	50 mmol/L Na-Phosphat-Puffer + 1 mmol/L MgCl <sub>2</sub>	20,5	170,7	17	6		85	28			1,15	0,3			X	X	X	[96]	
<i>Lactobacillus reuteri</i>	L103	CE - H+Z	50 mmol/L Na-Phosphat-Puffer + 1 mmol/L MgCl <sub>2</sub>	20,5	87,8	17	6	> 5,5	85	27,5				0,3			X	X	X	[96]	
<i>Lactobacillus reuteri</i>	L103	CE - H+Z	50 mmol/L Na-Phosphat-Puffer + 1 mmol/L MgCl <sub>2</sub>	20,5	26,8	17	6	15	84,3	27,5	33	24,5	1,3	0,3	1,1		42	43	15	[96]	
<i>Lactobacillus reuteri</i>	L103	E (P)	50 mmol/L Na-Phosphat-Puffer + 1 mmol/L MgCl <sub>2</sub>	20,5	3,9	30	6,5	10	78	37,8	22	15	1,5	0,5	2,6		42	46	13	[182]	
<i>Lactobacillus reuteri</i>	L461	E (P)	50 mmol/L Na-Phosphat-Puffer + 1 mmol/L MgCl <sub>2</sub>	20,5		30	6,5		94	29,3				0,3			56	37	8	[182]	
<i>Lactobacillus reuteri</i>	L103	E (P)	50 mmol/L Na-Phosphat-Puffer + 1 mmol/L MgCl <sub>2</sub>	20,5	63,4	37	6		80	36			1,7	0,5			41	47	12	[129]	
<i>Lactobacillus reuteri</i>	L103	E (P)	50 mmol/L Na-Phosphat-Puffer + 1 mmol/L MgCl <sub>2</sub>	20,5	K	37	6		70	30			1,4	0,4			62	34	3	[129]	
<i>Lactobacillus reuteri</i>	L103	rek. <i>E. coli</i> (P)	50 mmol/L Na-Phosphat-Puffer + 2 mmol/L MgCl <sub>2</sub>	20,7	24,2	23	6		73,5	25,5	30,2	17,8	1,7	0,3	1,4		38	58	4	[368]	



Tabelle A.7-4 (Fortsetzung)

Enzymeigenschaften			Reaktionsparameter				DH <sup>f</sup>		% des Gesamtzuckers			Transgalactolytische Aktivität			% der Gesamt-GOS <sup>g</sup>					Ref.
Enzymquelle	Stamm	Reinheit <sup>a</sup>	Medium <sup>b</sup>	ILC <sup>c</sup> [%]	E/S <sup>d</sup> [U/g]	T [°C]	pH	t <sup>e</sup> [h]	GOS	Glc	Gal	Glc/Gal	GOS/ reac.Lac	GOS/ Gal	DP2	DP3	DP4	DP5		
<i>Lactobacillus sakei</i>	Lb790	rek. <i>E. coli</i> (P)	50 mmol/L Na-Phosphat-Puffer + 1 mmol/L MgCl <sub>2</sub>	21,5	5,6	37	6,5	3	77	41	28	12	2,3	0,5	3,4	38	57	5	[69]	
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	L3	CE - US+Z	Puffer	23,5		45		18	60,4	32	21	7,4	2,8	0,5	4,3	84	15	1	[326]	
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	11842	CE - MF	Milchsalze-Puffer	30	33,3	50	6,8	2	35	17,1	11	6	1,7	0,5	2,7	45	52	3	[134]	
<i>Lactobacillus lactis</i>	DMF 3078	CE - MF	Milchsalze-Puffer	30	33,3	50	6,8	2	24	12,4	7	4	2,0	0,5	3,3	43	55	2	[134]	
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>		E (PP)	50 mmol/L Na-Phosphat-Puffer	40	125	37	7,0		40										[156]	
<i>Lactobacillus fermentum</i>	K4	rek. <i>E. coli</i> (CE-US)	50 mmol/L Na-Phosphat-Puffer	40		45	6,5	9	82	37	32	13	2,5	0,5	2,8				[349]	
<i>Lactobacillus plantarum</i>	70810	US-Zellen	50 mmol/L Na-Phosphat-Puffer	40		45	7	10	80	44,3	25	10	2,5	0,6	4,4	45	55	0	[183]	
<i>Lactobacillus reuteri</i>		E (PP)	50 mmol/L Na-Phosphat-Puffer	40	125	37	7,0		35										[156]	
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	ATCC 4356	CE	100 mmol/L Na-Phosphat-Puffer	45		50	6,8	15	25,6						X	X	X		[155]	
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	11842	CE - MF	Magermilch (10 % TM)	5	200	50	6,8	2	72	10,1	39	23	1,7	0,1	0,4	77	23	0	[134]	
<i>Lactobacillus fermentum</i>	K4	rek. <i>E. coli</i> (CE-US)	Milch	5		45	6,5		JA <sup>j</sup>										[349]	
<i>Lactobacillus lactis</i>	DMF 3078	CE - MF	Magermilch (10 % TM)	5	200	50	6,8	2	56	12	27	17	1,6	0,2	0,7	55	37	8	[134]	
<i>Lactobacillus acidophilus</i>		IZ	suppl. Büffelmagermilch	7		37	6,7	14	60,0	20,3			n. k. <sup>h</sup>	0,3		37	34	29	[365]	
<i>Lactobacillus casei</i>		IZ	suppl. Büffelmagermilch	7		37	6,7	14	42,9	14,9			n. k. <sup>h</sup>	0,3		38	32	30	[365]	



Tabelle A.7-4 (Fortsetzung)

Enzymeigenschaften			Reaktionsparameter					DH <sup>f</sup>		% des Gesamtzuckers			Transgalactolytische Aktivität			% der Gesamt-GOS <sup>g</sup>					Ref.
Enzymquelle	Stamm	Reinheit <sup>a</sup>	Medium <sup>b</sup>	ILC <sup>c</sup> [%]	E/S <sup>d</sup> [U/g]	T [°C]	pH	t <sup>e</sup> [h]	[%]	GOS	Glc	Gal	Glc/Gal	GOS/reac.Lac	GOS/Gal	DP2	DP3	DP4	DP5		
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	11842	CE - MIF	konz. Magermilch (20 % TM)	10	100	50	6,8		51	12,2	24	14	1,7	0,2	0,9	58	42	0		[134]	
<i>Lactobacillus lactis</i>	DMF 3078	CE - MIF	konz. Magermilch (20 % TM)	10	100	50	6,8		40	10,8	18	11	1,7	0,3	1,0	50	43	6		[134]	
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	11842	CE - MIF	konz. Magermilch (30 % TM)	15	66,7	50	6,8	2	42	12,5	19	11	1,6	0,3	1,1	55	45	0		[134]	
<i>Lactobacillus lactis</i>	DMF 3078	CE - MIF	konz. Magermilch (30 % TM)	15	66,7	50	6,8	2	24	9,7	9	5	1,9	0,4	2,0	43	52	5		[134]	
<i>Lactobacillus paracasei</i>	YSM03 08	CE - L+US	konz. Süßmolke (15 % TM)	10,5		30		4	1											[165] <sup>j</sup>	
<i>Lactobacillus reuteri</i>	L103	CE - H+Z	konz. Süßmolken-permeat (23,5 % TM)	19,4	92,8	17	5,8	> 5,5	85	25				0,3		X	X	X		[96]	
<i>Lactobacillus reuteri</i>	L103	CE - H+Z	konz. Süßmolken-permeat (23,5 % TM)	19,4	28,4	17		15	83	25	31	25,5	1,2	0,3	1,0	54	37	14		[96]	
<i>Lactobacillus paracasei</i>	YSM03 08	CE - L+US	konz. Süßmolke (30 % TM)	21,1		30		8	15											[165] <sup>j</sup>	
<i>Lactobacillus paracasei</i>	YSM03 08	CE - L+US	konz. Süßmolke (40 % TM)	28,1		30		4	50	17				0,3						[165] <sup>j</sup>	
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	ATCC 11842	CE - L	konz. Molke (18,2 % TM)			45		4	95	41,8	32,1	21,1	1,5	0,4	2,0					[16]	

<sup>a</sup> Enzymreinheit: E = Enzym, rek. = rekombinant produziertes Enzym mit entsprechendem Mikroorganismus, P = aufgereinigt (engl. *purified*), CE = grober Zellextrakt (engl. *crude extract*), mit einem Bindestrich getrennt: Aufschlussmethode: H = Homogenisation, Z = Zentrifugation; L = Lysozym, US = Ultraschall, MF = Microfluidizer, LZ = lebende Zellen.

<sup>b</sup> konz. = konzentriert, suppl. = mit Lactose supplementiert, TM = Trockenmasse.

<sup>c</sup> ILC = Anfangslactosekonzentration (engl. *initial lactose concentration*) in % w/v.

<sup>d</sup> E/S = Enzym/Substratverhältnis (Units pro Gramm Lactose), K = kontinuierliche GOS-Produktion.

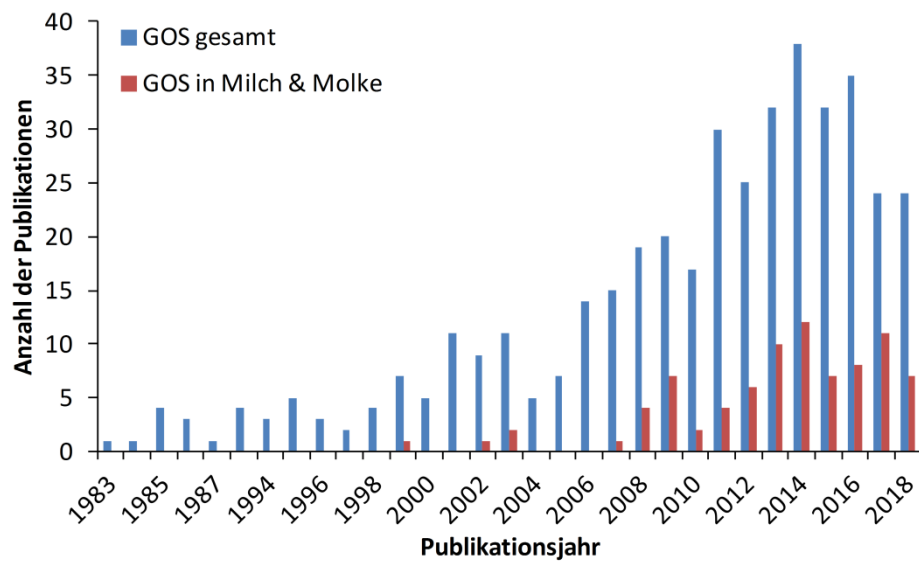
<sup>e</sup> t = Zeitpunkt der maximalen GOS-Ausbeute. <sup>f</sup> DH = Lactosehydrolysegrad zum Zeitpunkt der maximalen GOS-Ausbeute.

<sup>g</sup> DP = Kettenlänge (engl. *degree of polymerisation*); X = keine Angabe über die prozentuale Verteilung, aber entsprechende Fraktion ist vorhanden.

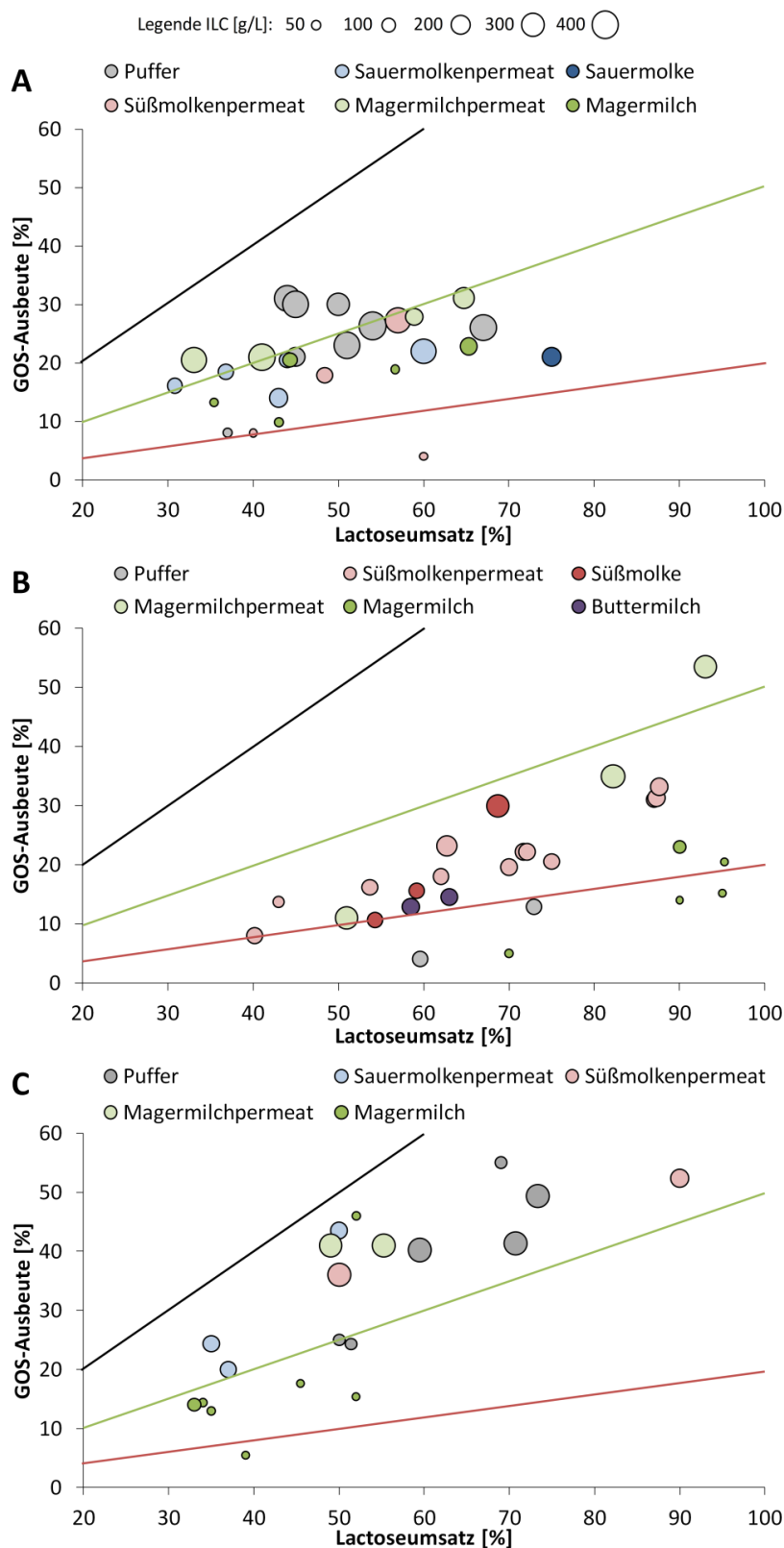
<sup>h</sup> n. k. = nicht kalkulierbar, da Glucose und/oder Galactose während der Reaktion verbraucht werden.

<sup>i</sup> ILC vermutl. etwas niedriger (laut Methoden-Teil: 15 mL Molke-Lösung + 5 mL Enzymlösung), aber keine eindeutige Beschreibung für alle dargestellten Versuche, z. T. Widersprüche (vgl. Fig. 5 und Fig. 6 der Publikation).

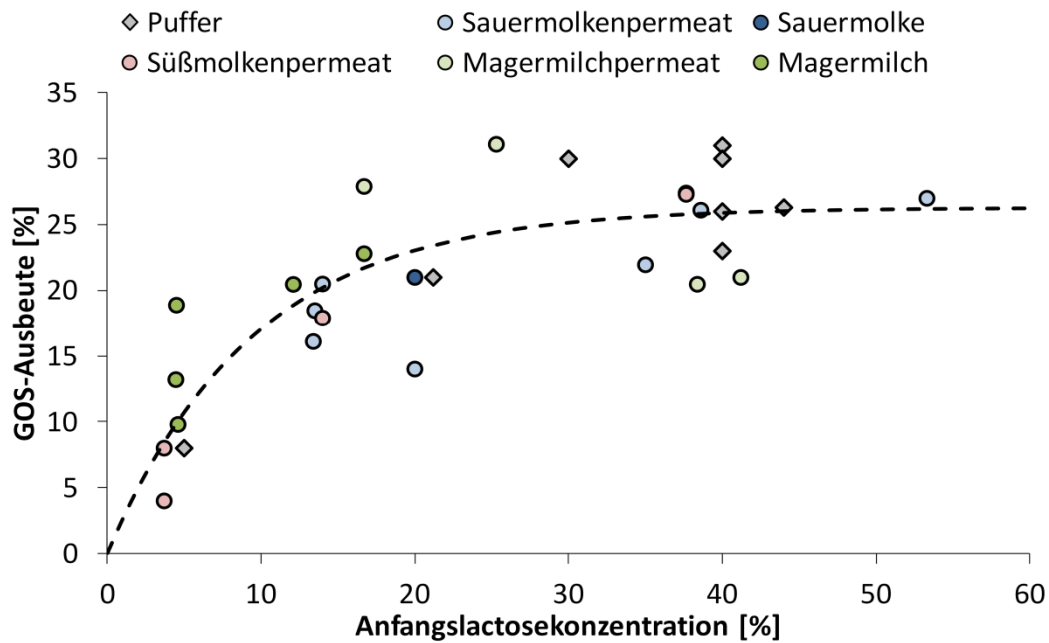
<sup>j</sup> keine Aussage bzgl. Ausbeute, nur Abbildung der GOS-Analyse mittels Dünnschichtchromatographie.



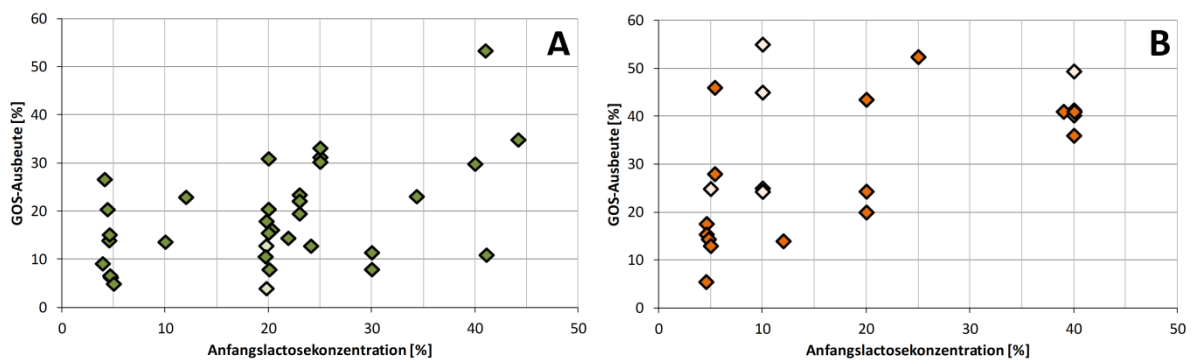
**Abbildung A.7-3:** Scopus-Recherche zum Thema GOS-Synthese allgemein (blau) sowie in Milch und Molke (rot), Abfrage am 19.7.2018. Suchbegriffe: TITLE-ABS-KEY(galactooligosaccharide\* OR galacto-oligosaccharide\*) AND TITLE-ABS-KEY(synthesis OR formation OR kinetic\*) und TITLE-ABS-KEY(galactooligosaccharide\* OR galacto-oligosaccharide\*) AND TITLE-ABS-KEY(synthesis OR formation OR kinetic\*) AND TITLE-ABS-KEY(milk OR whey OR permeate).



**Abbildung A.7-4:** GOS-Ausbeute mit  $\beta$ -Galactosidase aus *A. oryzae* (A), *K. lactis* (B) und *B. circulans* (C) in Abhängigkeit vom Lactoseumsatz zum Zeitpunkt der maximalen Ausbeute in verschiedenen Substraten der Molkereiindustrie und Puffern (vgl. auch Tabelle A.7-3). Die Blasenfläche ist proportional zur anfänglichen Lactosekonzentration (ILC). Die Linien dienen als Maß für die Transgalactosylierungsaffinität (prozentualer Anteil der umgesetzten Lactose zum Zielprodukt GOS, schwarz = 100 % (theoretisches Optimum), grün = 50 %, rot = 20 %). Modifizierte Versionen publiziert als Fig. 2, Fig. 3 und Fig. 4 in [CF4].



**Abbildung A.7-5:** Korrelation zwischen Anfangslactosekonzentration (ILC) und GOS-Ausbeute (Y) für  $\beta$ -Galactosidase aus *Aspergillus oryzae* in Puffer und Molkereisubstraten, vgl. auch Tabelle A.7-3. Die gestrichelte Linie gibt die Anpassung an eine exponentielle Sättigung wieder unter Einbeziehung aller Datenpunkte ( $Y = Y_{\max} \cdot (1 - \exp(-k \cdot \text{ILC}))$ ) mit  $Y_{\max} = 26,27\%$ ,  $k = 0,104$ . Modifizierte Version publiziert als Fig. 7 in [CF4].



**Abbildung A.7-6:** Korrelation zwischen Anfangslactosekonzentration und GOS-Ausbeute für  $\beta$ -Galactosidase aus *Kluyveromyces lactis* (A) und *Bacillus circulans* (B) in Puffer (helle Symbole) und Molkereisubstraten (dunkle Symbole), vgl. auch Tabelle A.7-3.

Tabelle A.7-5: Zusammensetzung kommerziell erhältlicher GOS-Produkte sortiert nach Enzymquelle, k. A. = keine Angabe.

Firma	Markenname	Enzymquelle	Zuckerkonzentration [% bezogen auf Trockenmasse] <sup>a</sup>							max. DP <sup>b</sup>	Verknüpfungen <sup>c</sup>	Ref.
			Glc	Gal	Lac	DP2	DP3	DP4	DP≥5	GOS		
Int. Dairy Ingredients Inc.	Floraïd™ GOS (Pulver) <sup>d</sup>	<i>A. oryzae</i>	24,7	9,33	28,6	8,4 (22)	17,1 (44)	7,2 (18)	3,9 (10)	39	8 k. A.	[197]
Nestlé Nutrition	Pulver <sup>e</sup>	<i>A. oryzae</i> GL470	10	5	20 -40	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	46	5 $\beta(1 \rightarrow 3)$ , $\beta(1 \rightarrow 4)$ , $\beta(1 \rightarrow 6)$	[200]
Vitalus Nutrition Inc.	VITAGOS™ <sup>f</sup>	<i>A. oryzae</i> GL470, <i>K. lactis</i>	16,8	2,5	15	18 (27)	32,5 (50)	11,3 (17)	3,9 (6)	65,6	k. A. $\beta(1 \rightarrow 3)$ , $\beta(1 \rightarrow 4)$ , $\beta(1 \rightarrow 6)$	[201, 202]
Clasado Inc.	Bimuno® Sirup <sup>g</sup>	<i>B. bifidum</i> NCIMB 41171	22	1,6	12,3	26,5 (41)	21,3 (33)	11,2 (17)	5,3 (8)	64,2	k. A. $\beta(1 \rightarrow 3)$ , $\beta(1 \rightarrow 6)$ , $\alpha(1 \rightarrow 6)$	[203, 204]
Friesland Campina Domo	Vivinal® GOS	<i>B. circulans</i> ATCC 31382 <sup>h</sup>	20,3	1,1	18,6	19,8 (33)	23,4 (39)	10,8 (18)	6,0 (10)	59,9	8 $\beta(1 \rightarrow 2)$ , $\beta(1 \rightarrow 3)$ , $\beta(1 \rightarrow 4)$ , $\beta(1 \rightarrow 6)$	[182]
GTC Nutrition <sup>i</sup>	Purimune Pulver	<i>B. circulans</i> ATCC 31382	0-1	0-0,5	7-10	16-21 (21)	38-51 (49)	25-29 (30)		90-92	5 $\beta(1 \rightarrow 3)$ , $\beta(1 \rightarrow 4)$ , $\beta(1 \rightarrow 6)$	[196, 205]
Ingredion Inc.	BIOLIGO® GL 5700 IMF Sirup	<i>B. circulans</i> ATCC 31382 <sup>i</sup>	22	0,8	17,5	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	57	k. A.	[206]
New Francisco Biotechnology Co. Ltd	King-Prebiotics GOS-1000-P (Pulver) <sup>j</sup>	<i>B. circulans</i>	1			0 (0)	39 (39)	27 (27)	33 (33)	99	8 $\beta(1 \rightarrow 4)$ , u. a.	[207]
New Francisco Biotechnology Co. Ltd	King-Prebiotics GOS-570-S (Sirup)	<i>B. circulans</i>	20,5	1,5	18	13,8 (23)	25,2 (42)	12,6 (21)	8,4 (14)	60	8 $\beta(1 \rightarrow 4)$ , u. a.	[208]
Neo Cremar, Co., Ltd	Nature's GOS	<i>B. circulans</i> M3-1 <sup>k</sup>	19	0,8	18	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	62	k. A. $\beta(1 \rightarrow 4)$ , u. a.	[209]
Neo Cremar, Co., Ltd	Mother's OLIGO/Beauty OLIGO <sup>l</sup>	<i>B. circulans</i> M3-1 <sup>k</sup>	1,9	3,5	17,5	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	77,2	k. A. $\beta(1 \rightarrow 4)$ , u. a.	[209]

Tabelle A.7-5 (Fortsetzung)

Firma	Markenname	Enzymquelle	Zuckerkonzentration [% bezogen auf Trockenmasse] <sup>a</sup>								max. DP <sup>b</sup>	Verknüpfungen <sup>c</sup>	Ref.
			Glc	Gal	Lac	DP2	DP3	DP4	DP≥5	GOS			
Neo Cremar, Co., Ltd	Goat OLIGO <sup>m</sup>	<i>B. circulans</i> M3-1 <sup>k</sup>	20	1,9	18,7	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	59,3	k. A.	<b>β(1→4)</b> , u. a.	[209]
Yakult Pharmaceutical Industry Co., Ltd.	Oligomate® 55	<i>B. singularis</i> , <i>K. lactis</i>	22,4	8,6	12,7	14,8 (26)	34,4 (61)	4,7 (8)	2,5 (4)	56,4	6	β(1→2), β(1→3), <b>β(1→4)</b> , β(1→6)	[186]
Nissin Sugar Co., Ltd.	Cup-Oligo®	<i>C. laurentii</i>	25-30			k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	70-75	k. A.	<b>β(1→4)</b> , u. a.	[127, 210, 211]
Dairy Crest Ltd.	Promovita® GOS <sup>n</sup>	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	57-70	k. A.	k. A.	[212]
Dairygold Food Ingredients	Dairygold GOS	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	[213]

<sup>a</sup> Glc = Glucose, Gal = Galactose, Lac = Lactose, DP = Polymerisationsgrad, GOS = Gesamt-GOS. Werte in Klammern geben den Anteil an den Gesamt-GOS in % an (gerundet, daher Abweichung von 100 % möglich).

<sup>b</sup> maximale Kettenlänge, sofern angegeben.

<sup>c</sup> neu synthetisierte Verknüpfungen, ungeachtet der β-(1,4)- Verknüpfung von Lactose, welche folglich in Mono-/Di-/Tri- Galactosyllactosen präsent ist. Fettdruck = die vorherrschende Verbindung.

<sup>d</sup> enthält in Spuren (< 1 %) auch Saccharose, Maltose und Fructose.

<sup>e</sup> noch kein Handelsname bekannt, durch Nanofiltration teilweise Entfernung der Monosaccharide und Lactose. Als Substrat dient zum Teil entmineralisiertes Molkenpermeatkonzentrat (50 % TM), dadurch Spuren von 3'- und 6'-Sialyllactose.

<sup>f</sup> durch Filtrationsschritte teilweise Aufreinigung und somit Erhöhung des GOS- Anteils (vgl. auch Patentschrift WO 2017/120678 A1 [187] mit Gesamt-GOS-Ausbeute ca. 41 %).

<sup>g</sup> enthält neben β-verknüpften GOS auch bis zu 7 % α-(1,6)-Galactobiose (üblicherweise 3,5 %).

<sup>h</sup> entspricht dem Enzympräparat Biolacta N5.

<sup>i</sup> GTC Nutrition wurde 2004 von Corn Products International, Inc. (heute Ingredion Inc.) erworben. Mittlerweile ist das Produkt durch BIOLIGO<sup>®</sup> ersetzt worden. Dieses Produkt entspricht laut Herstellerdatenblatt (Verweis auf GRAS- Dokumente GRN 285 und 286) dem Produkt Purimune, jedoch ohne weitere Aufreinigung der Reaktionslösung. Es wird daher vermutet, dass auch hier die Enzymquelle *B. circulans* ATCC 31382 ist.

<sup>j</sup> zusätzliche Aufreinigung durch Hefefermentation mit *K. lactis*.

<sup>k</sup> entspricht dem Enzympräparat Lactazyme B von GenoFocus.

<sup>l</sup> zusätzliche Aufreinigung durch Hefefermentation mit *Saccharomyces cerevisiae* CBS5926.

<sup>m</sup> Lactose aus Ziegenmilch gewonnen.

<sup>n</sup> auch vermarktet unter Nutrabiotic<sup>®</sup> GOS für die Tiernahrung bzw. NZMP SureStart<sup>™</sup> GOS für die Säuglingsnahrung bei Fonterra.

## 7.2 Anhang zu Kapitel 3

### 7.2.1 Verwendete Geräte

**Tabelle A.7-6:** Übersicht über die im Rahmen der Dissertation verwendeten Geräte.

Gerät	Modellbezeichnung	Hersteller
Autoklav	Varioklav 75 S	HP Medizintechnik GmbH
Autoklav	Varioklav 400E	HP Medizintechnik GmbH
Feinwaage	AC 211S	Sartorius AG
Fermentorsystem	BioStat B	Sartorius Stedim Systems GmbH
FPLC-System	Programmer: GP-250 Plus Pumpe: P-500 UV-Detektor: Uvicord SII	Pharmacia Biotech
HPLC-System	Interface: D-6000A Pumpe: L-6200A Autosampler: AS-4000A Säulenofen: L-5025 RI-Detektor: L-7490	Merck-Hitachi
HPLC-System "LaChrom Elite"	Pumpe: L-2130 Autosampler: L-2200 Säulenofen: L-2350 RI-Detektor: 5450	VWR International GmbH
Homogenisator	PANDA	GEA Niro Soavi
Ionenchromatograph	Aquion™	Thermo Fisher Scientific GmbH
Ionenchromatograph	DX-100	Dionex Corporation
Magnetrührerplatte	SB 162-3	Stuart
Muffelofen	EF 11/8B	Lenton
pH-Meter	pH537	WTW GmbH
Photometer	Genesys 10S UV-Vis	Thermo Fisher Scientific GmbH
Proteinanalysator nach Kjeldahl	Tecator™ Digestor Auto Tecator™ Scrubber Kjeltec™ 8400 Analyzer Unit	FOSS Analytical AB
Schüttelinkubator	KS 4000 i control	IKA®-Werke GmbH & Co. KG
Thermomixer	TS-100C	BioSan

**Tabelle A.7-6** (Fortsetzung)

Gerät	Modellbezeichnung	Hersteller
Thermomixer	5436	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH
Trockenschrank	1705307000313	Binder GmbH
Ultraschallbad	Ultrasonic Cleaner	VWR International GmbH
Vortexer	Minishaker MS 1	IKA®-Werke GmbH & Co. KG
Wasserbad	1092	GFL - Gesellschaft für Labortechnik mbH
Zentrifuge	Sigma 3K30	Sigma Laborzentrifugen GmbH
Zentrifuge	VR-1	Heraeus Instruments GmbH
Zentrifuge	Biofuge 28 RS	Heraeus Sepatech
Zellaufschlussgerät	Disruptor Genie Digital	Scientific Industries Inc.

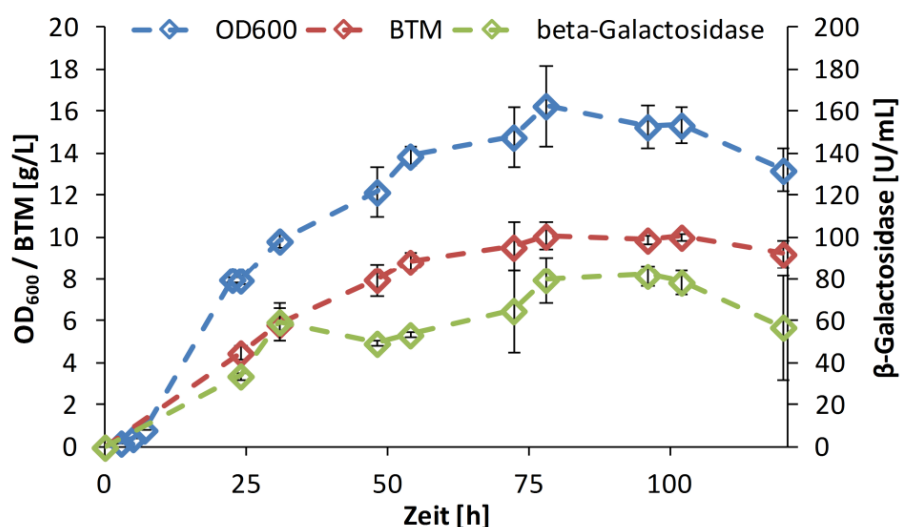
## 7.2.2 Zusammensetzung MRS-Medium

**Tabelle A.7-7:** Zusammensetzung des Standard-MRS-Mediums.

Komponente	Lieferant/Hersteller	c [g/L]
Fleischpepton	Sigma Aldrich	10,00
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH	4,00
Tween 80	Carl Roth GmbH	1,00
Natriumacetat	Sigma Aldrich	5,00
Magnesiumsulfat	Carl Roth GmbH	0,20
Fleischextraktpaste	Carl Roth GmbH	8,00
Lactose	Carl Roth GmbH	20,00
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck	2,00
Ammoniumcitrat	Serva	2,00
Mangan (II) sulfat	Merck	0,05



### 7.2.3 Wachstum von *C. laurentii*



**Abbildung A.7-7:** Wachstum (OD<sub>600</sub> bzw. BTM) und β-Galactosidase-Synthese (Assay bei 65 mmol/L oNPG in 50 mmol/L Na-Phosphat-Puffer pH 5,0, 50°C) von *C. laurentii* DSM 27153 in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer, n = 2.

### 7.2.4 Anfangslactosekonzentrationen

Die in Kapitel 4.3 verwendeten Bezeichnungen für die Anfangslactosekonzentration (ILC) stellen gerundete (Soll-) Werte dar. Die folgende Tabelle gibt die tatsächlichen ILC-Werte nach HPLC-Messung wieder.

**Tabelle A.7-8:** Tatsächliche Anfangslactosekonzentrationen der GOS-Synthese-Versuche.

β-Galactosidase	Medium	Sollwert (Bezeichnung in der Abbildung)			
		39 g/L	100 g/L	200 g/L	300 g/L
<i>K. lactis</i>	PEM-Puffer	37,7	97,2	197,1	302,8
<i>K. lactis</i>	Süßmolke <sup>a</sup>	38,8	97,8	193,5	298,9
<i>K. lactis</i>	Sauermolke <sup>b</sup>	37,8	99,3	203,7	277,5
<i>A. oryzae</i>	deion. Wasser	38,3	93,5	200,5	-
<i>A. oryzae</i>	Süßmolke <sup>a</sup>	38,5	91,7	189,5	-
<i>A. oryzae</i>	Sauermolke <sup>b</sup>	39,3	90,8	195,7	-

<sup>a</sup> rekonstituiert aus Pulver von Molkerei Meggle Wasserburg GmbH & Co. KG.

<sup>b</sup> rekonstituiert aus Pulver von Euroduna Food Ingredients GmbH.

## 7.2.5 Katalaseaktivität

**Tabelle A.7-9:** Katalaseaktivität in verschiedenen Puffer-Systemen zur Berechnung des gewünschten E/S-Verhältnisses bei der GOS-Synthese.

Puffer	pH	Enzymaktivität bei RT <sup>c</sup> [U/mL]	Enzymaktivität bei 25°C <sup>g</sup> [U/mL]
50 mmol/L Na-Acetat	4,5	27.720 ± 2.682 <sup>d</sup>	34.651
50 mmol/L PEM <sup>a</sup>	6,5	46.952 ± 761 <sup>e</sup>	58.690
50 mmol/L K-Phosphat <sup>b</sup>	7,0	48.327 ± 1.495 <sup>f</sup>	-

<sup>a</sup> nach FCC IV-Methode.

<sup>b</sup> nach Sigma-Aldrich-Assay.

<sup>c</sup> Raumtemperatur.

<sup>d</sup> n =4.

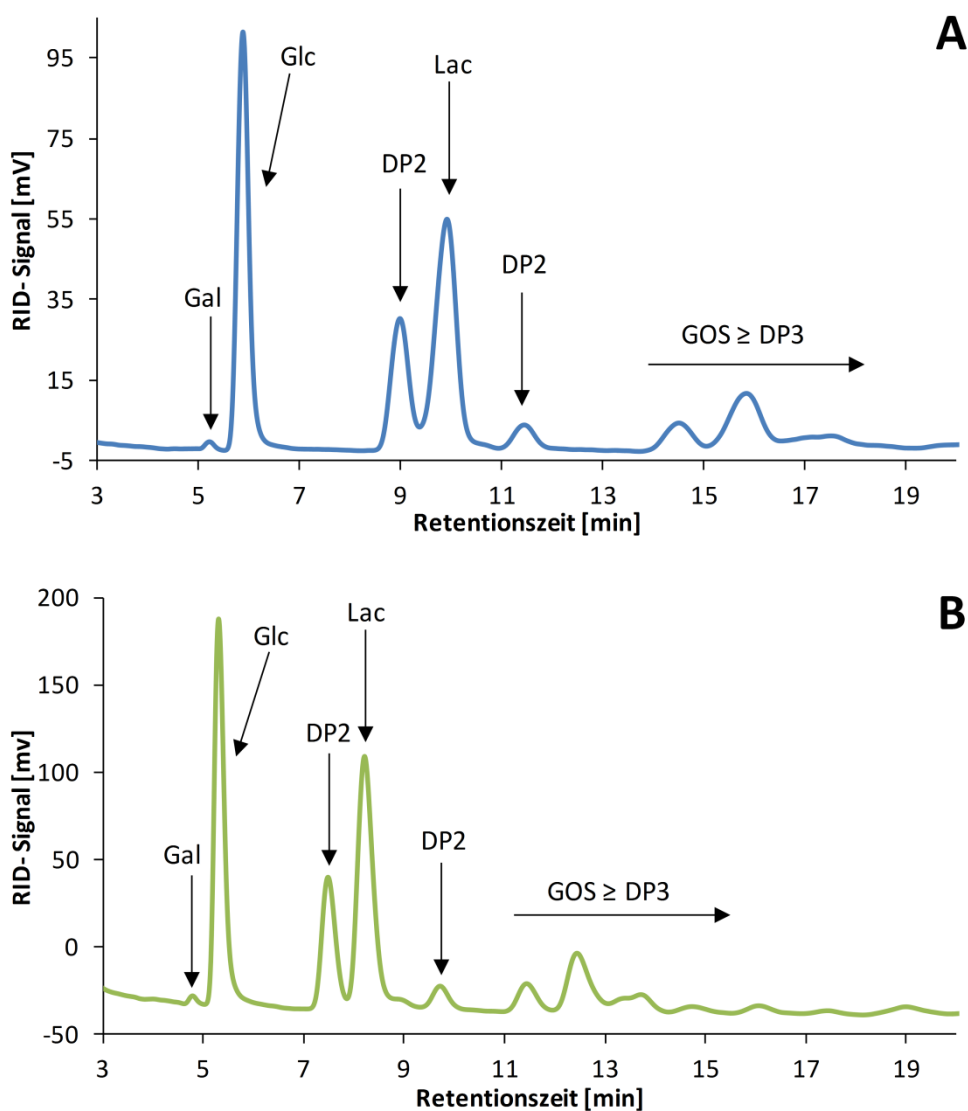
<sup>e</sup> n =3.

<sup>f</sup> n =5.

<sup>g</sup> korrigierte Werte, da GOS-Synthese bei 25°C stattfindet, die Messung der Katalaseaktivität jedoch bei Raumtemperatur (RT), siehe auch Abbildung 4-26.

### 7.2.6 Vergleich GOS-Disaccharidanalytik

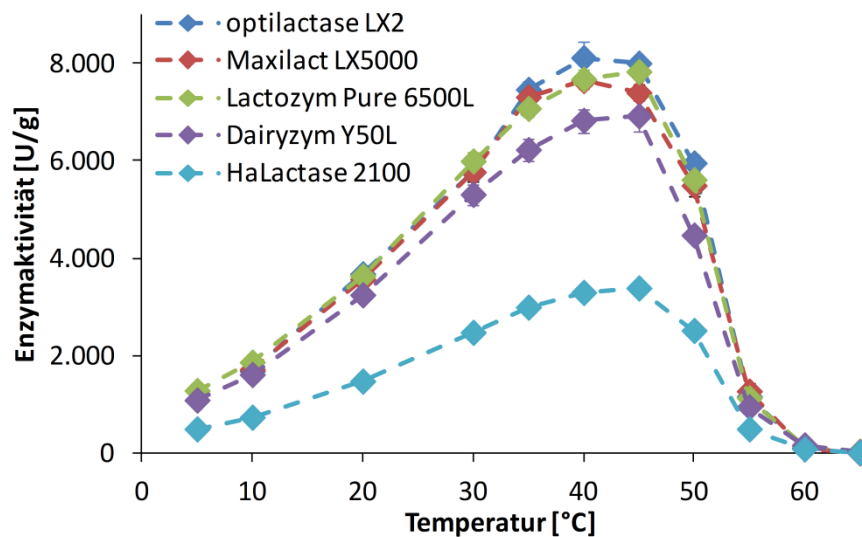
Zur Bestimmung des Anteils an Lactose bzw. der GOS-Disacchariden an den Gesamt-Disacchariden (erhalten aus der Trennung auf der Hi-Plex Na-Säule) wurden die Säulen Zorbax Carbohydrate (250 mm x 4,6 mm, Agilent Technologies) bzw. Microsorb-MV 100 NH<sub>2</sub> (250 mm x 4,6 mm, Agilent Technologies) eingesetzt. Mit beiden wurde ein äquivalentes Trennergebnis in der interessierenden Region erzielt, wie die Analyse des GOS-Sirups *VIVINAL GOS* von Friesland Campina in Abbildung A.7-8 zeigt.



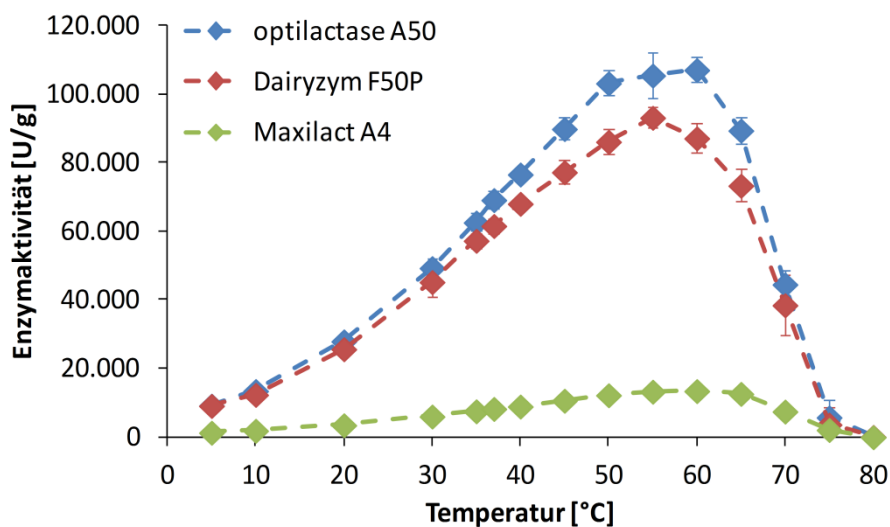
**Abbildung A.7-8:** HPLC-Chromatogramme des GOS-Sirups *VIVINAL GOS* von Friesland Campina auf der Zorbax Carbohydrate-Säule (A) und der Microsorb-MV 100 NH<sub>2</sub>-Säule (B). Chromatographische Bedingungen siehe Kapitel 3.7. Identifizierung der Komponenten durch Vergleich der Retentionszeiten mit Standard-Substanzen (Gal = Galactose, Glc = Glucose, Lac = Lactose). Raffinose bei 15,1 min (Zorbax) bzw. 10,8 min (Microsorb) dient als Marker für die Elution von GOS  $\geq$  DP3 (nicht dargestellt). Alle Zucker, die eher eluieren werden als GOS-Disaccharide betrachtet. Modifizierte Abbildung publiziert als Fig. S1 (supplemental data) in [CF3].

## 7.3 Anhang zu Kapitel 4

### 7.3.1 Temperaturabhängigkeit von verschiedenen $\beta$ -Galactosidasen



**Abbildung A.7-9:** Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Temperatur für  $\beta$ -Galactosidase-Präparate aus *K. lactis*. HaLactase 2100 ist ein Pulverprodukt, alle anderen sind Flüssigpräparate. Assaybedingungen: 8,3 mmol/L oNPG in PEM-Puffer pH 6,5, n = 3. Teile der Abbildung sind Bestandteil von Fig. 2 in [CF5].



**Abbildung A.7-10:** Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Temperatur für  $\beta$ -Galactosidase-Präparate aus *A. oryzae*. Optilactase A50 und Dairyzym F50P sind Pulverprodukte, Maxilact A4 ist ein Flüssigpräparat. Assaybedingungen: 22 mmol/L oNPG in Na-Acetat-Puffer pH 4,5, n = 3. Teile der Abbildung sind Bestandteil von Fig. 2 in [CF5].

### 7.3.2 Aktivatoren und Inhibitoren

**Tabelle A.7-10:** Effekt mono- und divalenter Kationen auf die relative  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität (Werte in % bezogen auf die Aktivität ohne Effektor), n. b. = nicht bestimmt.

Enzymquelle	c [mmol/L]	Na <sup>+</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>
<i>A. oryzae</i> <sup>a</sup>	0	100 ± 6	100 ± 6	100 ± 6	100 ± 6	100 ± 6
	1	98 ± 6	99 ± 10	101 ± 7	100 ± 8	103 ± 5
	10	98 ± 3	97 ± 6	101 ± 6	102 ± 8	100 ± 8
	100	94 ± 9	94 ± 9	97 ± 6	n. b.	n. b.
<i>K. lactis</i> <sup>b</sup>	0	100 ± 11	100 ± 11	100 ± 11	100 ± 11	100 ± 11
	1	144 ± 10	133 ± 7	146 ± 18	96 ± 7	114 ± 19
	10	409 ± 40	424 ± 43	467 ± 52	100 ± 6	138 ± 17
	100	772 ± 108	2399 ± 497	9005 ± 4108	n. b.	n. b.
<i>L. acidophilus</i> LA3 <sup>c</sup>	0	100 ± 3	100 ± 3	100 ± 3	100 ± 3	100 ± 3
	1	179 ± 1	190 ± 3	238 ± 2	76 ± 1	187 ± 1
	10	323 ± 1	290 ± 0	340 ± 1	35 ± 2	181 ± 0
	100	363 ± 1	345 ± 1	369 ± 4	n. b.	n. b.
<i>L. bulgaricus</i> LB4 <sup>c</sup>	0	100 ± 1	100 ± 1	100 ± 1	100 ± 1	100 ± 1
	1	170 ± 1	145 ± 1	172 ± 1	99 ± 0	111 ± 0
	10	460 ± 0	274 ± 0	364 ± 1	93 ± 1	115 ± 2
	100	698 ± 0	403 ± 0	461 ± 2	n. b.	n. b.
<i>L. bulgaricus</i> LB8 <sup>c</sup>	0	100 ± 7	100 ± 7	100 ± 7	100 ± 7	100 ± 7
	1	215 ± 0	137 ± 3	147 ± 1	88 ± 2	106 ± 1
	10	1004 ± 3	317 ± 1	503 ± 2	117 ± 5	102 ± 2
	100	2211 ± 3	756 ± 4	1642 ± 3	n. b.	n. b.
<i>L. bulgaricus</i> SP5 <sup>c</sup>	0	100 ± 9	100 ± 9	100 ± 9	100 ± 9	100 ± 9
	1	185 ± 1	122 ± 2	190 ± 6	91 ± 2	115 ± 2
	10	657 ± 0	259 ± 3	380 ± 3	133 ± 9	112 ± 2
	100	1534 ± 0	521 ± 1	1127 ± 1	n. b.	n. b.
<i>L. reuteri</i> LR92 <sup>c</sup>	0	100 ± 2	100 ± 2	100 ± 2	100 ± 2	100 ± 2
	1	142 ± 0	142 ± 1	183 ± 0	109 ± 0	125 ± 2
	10	282 ± 0	279 ± 1	331 ± 1	106 ± 1	132 ± 0
	100	381 ± 2	342 ± 0	376 ± 3	n. b.	n. b.
<i>C. laurentii</i> <sup>d</sup>	0	100 ± 15	100 ± 15	100 ± 15	100 ± 15	100 ± 15
	1	97 ± 14	90 ± 6	108 ± 3	103 ± 9	76 ± 2
	10	81 ± 7	68 ± 2	95 ± 1	102 ± 4	64 ± 1
	100	65 ± 5	17 ± 17	82 ± 1	117 ± 10	17 ± 1

<sup>a</sup> Produkt optilactase A50, n = 6 für c = 1–100 mmol/L, n = 42 für c = 0 mmol/L. <sup>b</sup> Produkt optilactase LX2, n = 6 für c = 1–100 mmol/L, n = 42 für c = 0 mmol/L. <sup>c</sup> Rohextrakte aus *Lactobacillus* sp., n = 2 für c = 1–100 mmol/L, n = 14 für c = 0 mmol/L. <sup>d</sup> ganze Zellen von *Cryptococcus laurentii*, n = 4 für Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> und Ca<sup>2+</sup>, n = 2 für NH<sub>4</sub><sup>+</sup> und Mg<sup>2+</sup>, n = 16 für c = 0 mmol/L. Teile der Tabelle sind Bestandteil von Tab. 2 in [CF5] und Tab. 4 in [CF1].

**Tabelle A.7-11:** Einfluss der Hydrolyseprodukte Glucose und Galactose auf die relative  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität (Werte in % bezogen auf die Aktivität ohne Effektor).

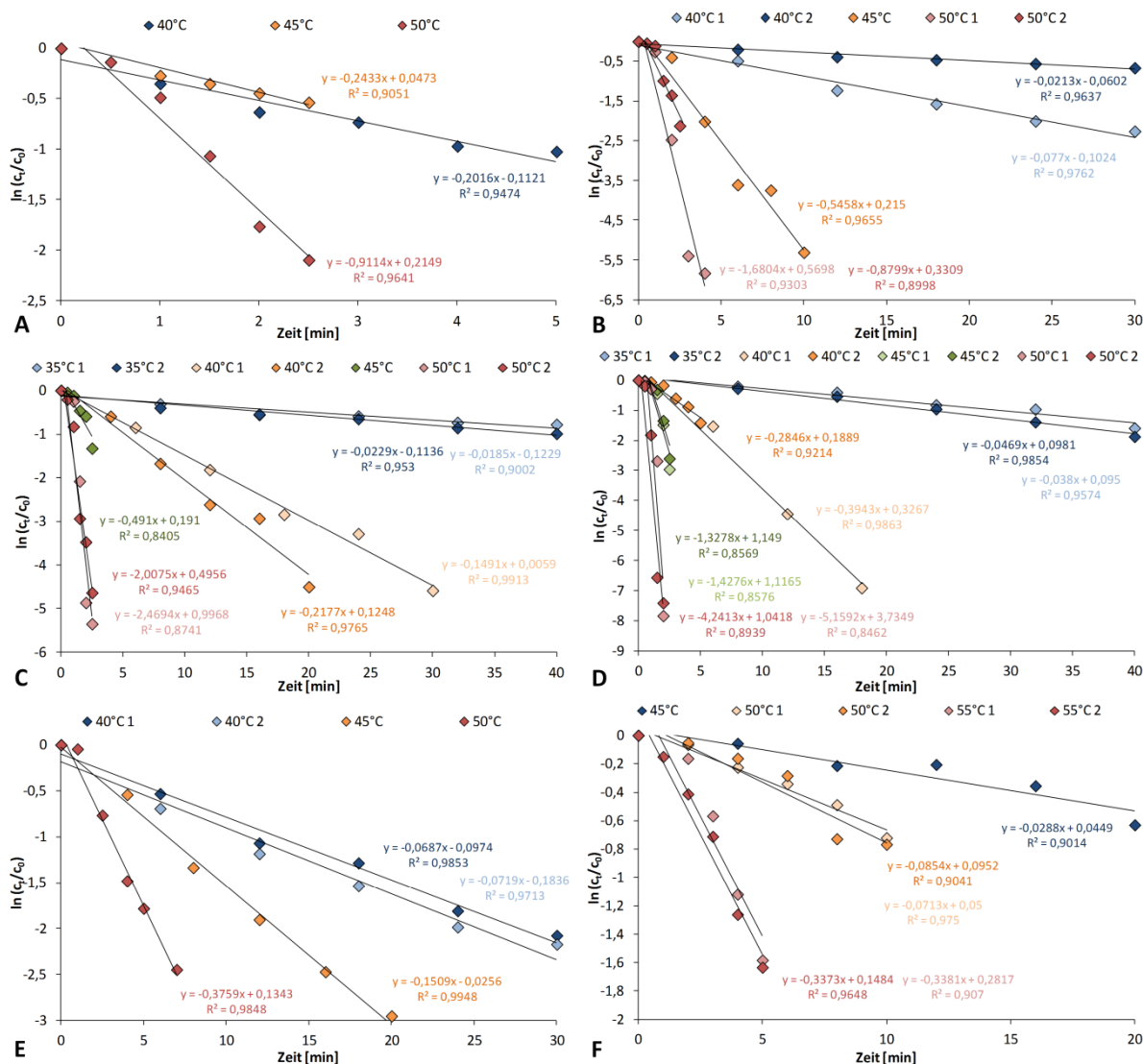
Enzymquelle	c [mmol/L]	Glucose	Galactose
<i>A. oryzae</i> <sup>a</sup>	0	100 ± 6	100 ± 6
	1	97 ± 11	100 ± 6
	10	108 ± 8	97 ± 6
	100	119 ± 5	81 ± 4
<i>K. lactis</i> <sup>b</sup>	0	100 ± 11	100 ± 11
	1	104 ± 16	103 ± 12
	10	105 ± 11	84 ± 14
	100	110 ± 13	99 ± 11
<i>L. acidophilus</i> LA3 <sup>c</sup>	0	100 ± 3	100 ± 3
	1	101 ± 0	107 ± 1
	10	104 ± 1	103 ± 1
	100	132 ± 1	112 ± 1
<i>L. bulgaricus</i> LB4 <sup>c</sup>	0	100 ± 1	100 ± 1
	1	98 ± 1	98 ± 0
	10	98 ± 1	91 ± 1
	100	113 ± 1	81 ± 1
<i>L. bulgaricus</i> LB8 <sup>c</sup>	0	100 ± 7	100 ± 7
	1	108 ± 3	94 ± 3
	10	106 ± 2	106 ± 3
	100	133 ± 1	111 ± 0
<i>L. bulgaricus</i> SP5 <sup>c</sup>	0	100 ± 9	100 ± 9
	1	106 ± 5	101 ± 7
	10	97 ± 4	93 ± 7
	100	119 ± 1	82 ± 3
<i>L. reuteri</i> LR92 <sup>c</sup>	0	100 ± 2	100 ± 2
	1	102 ± 2	96 ± 0
	10	99 ± 1	92 ± 1
	100	101 ± 1	69 ± 0
<i>C. laurentii</i> <sup>d</sup>	0	100 ± 7	100 ± 7
	1	95 ± 4	98 ± 2
	10	92 ± 5	98 ± 4
	100	48 ± 9	77 ± 5

<sup>a</sup> Produkt optilactase A50, n = 6 für c = 1–100 mmol/L, n = 42 für c = 0 mmol/L.<sup>b</sup> Produkt optilactase LX2, n = 6 für c = 1–100 mmol/L, n = 42 für c = 0 mmol/L.<sup>c</sup> Rohextrakte aus *Lactobacillus* sp., n = 2 für c = 1–100 mmol/L, n = 14 für c = 0 mmol/L.<sup>d</sup> ganze Zellen von *Cryptococcus laurentii*, n = 3 für c = 1–100 mmol/L, n = 10 für c = 0 mmol/L.

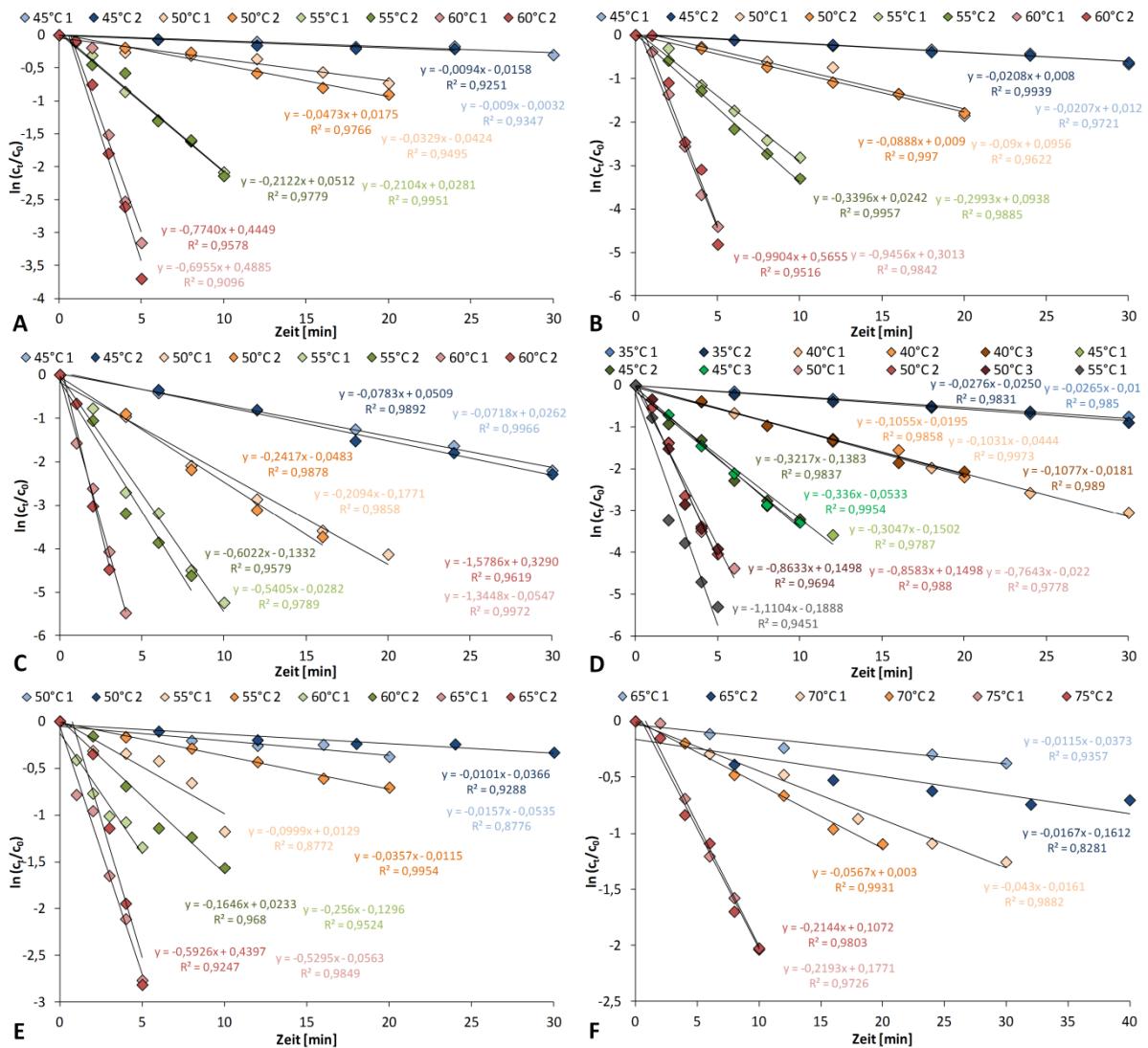
Teile der Tabelle sind Bestandteil von Tab. 4 in [CF1].

### 7.3.3 Grafiken zur $\beta$ -Galactosidase-Stabilität

Kinetik der Inaktivierung in Abhängigkeit von Enzymquelle, pH und Medium:

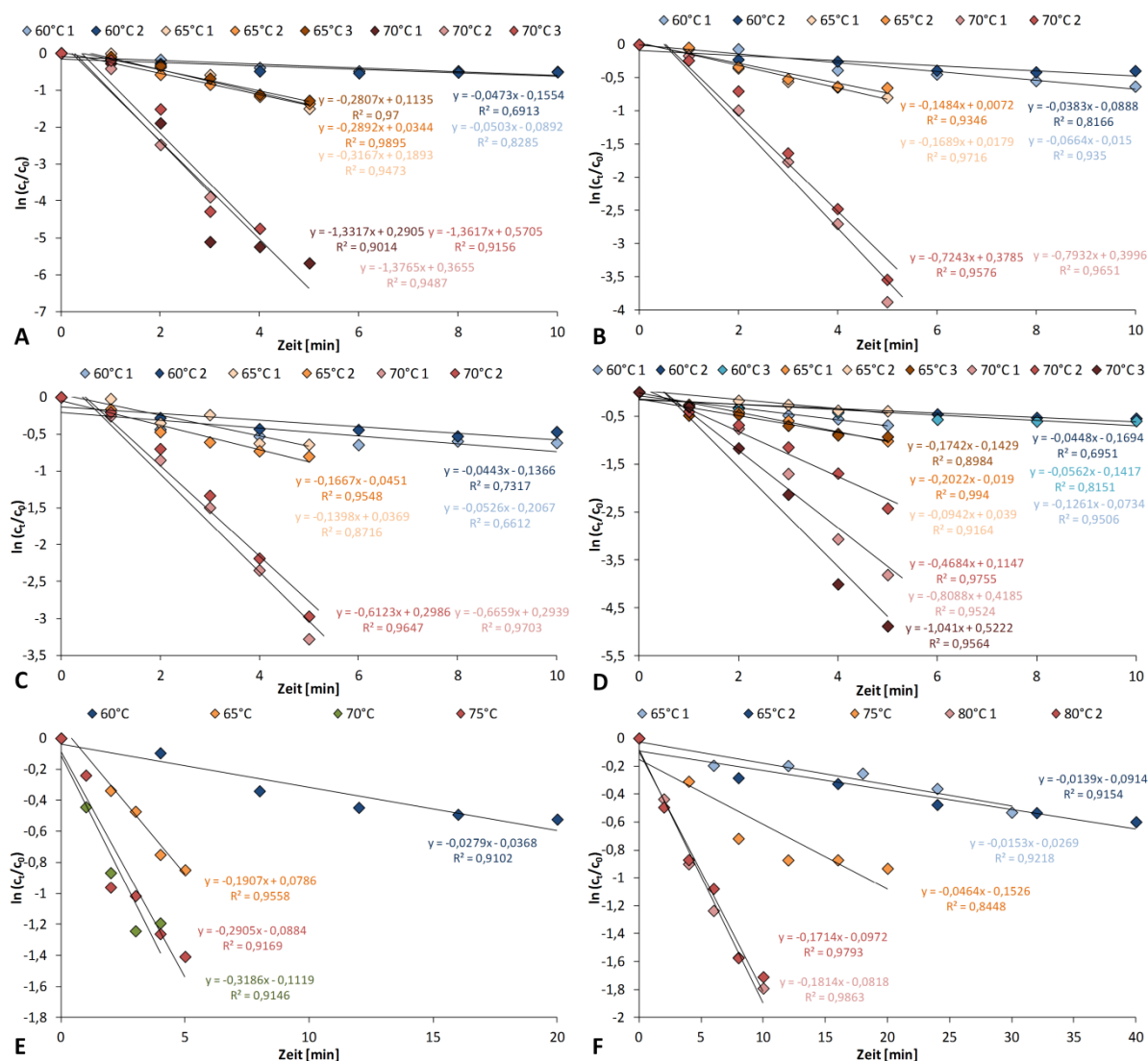


**Abbildung A.7-11:** Inaktivierungskinetik von  $\beta$ -Galactosidase aus *K. lactis* (optilactase LX2) in 50 mmol/L Na-Phosphat-Puffer pH 6,0 (A), pH 6,5 (B), pH 7,0 (C) und pH 7,5 (D) sowie in Süßmolke (E, 39 g/L Lactose) und konz. Süßmolke (F, 200 g/L Lactose). Süßmolke rekonstituiert aus Pulver (Molkerei Meggle Wasserburg GmbH & Co. KG).

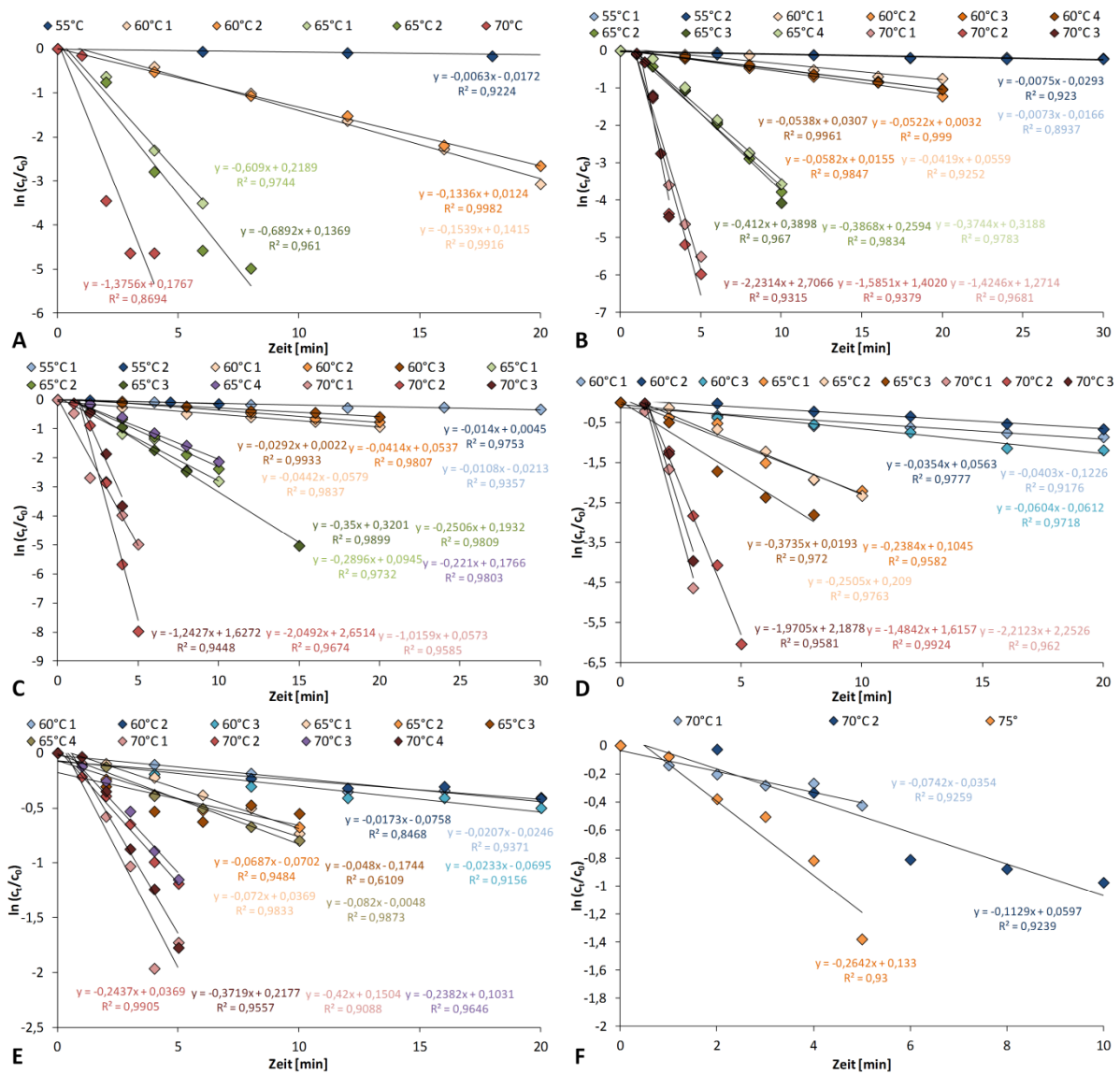


**Abbildung A.7-12:** Inaktivierungskinetik von  $\beta$ -Galactosidase aus *L. acidophilus* LA3 (Rohextrakt) in 50 mmol/L Na-Phosphat-Puffer pH 6,0 (A), pH 6,5 (B), pH 7,0 (C) und pH 7,5 (D) sowie in Süßmolke (E, 39 g/L Lactose) und konz. Süßmolke (F, 200 g/L Lactose). Süßmolke rekonstituiert aus Pulver (Molkerei Meggle Wasserburg GmbH & Co. KG).

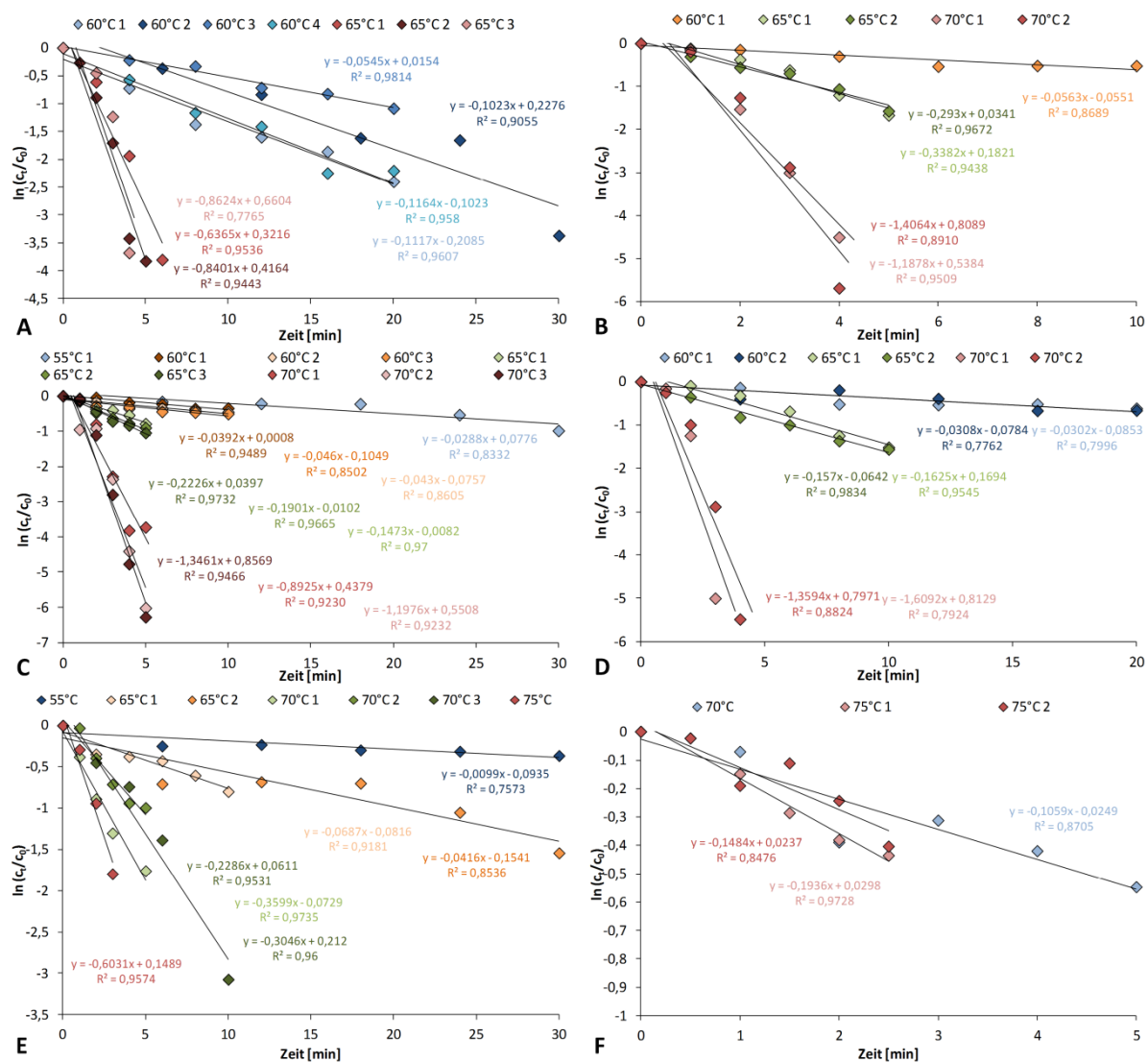




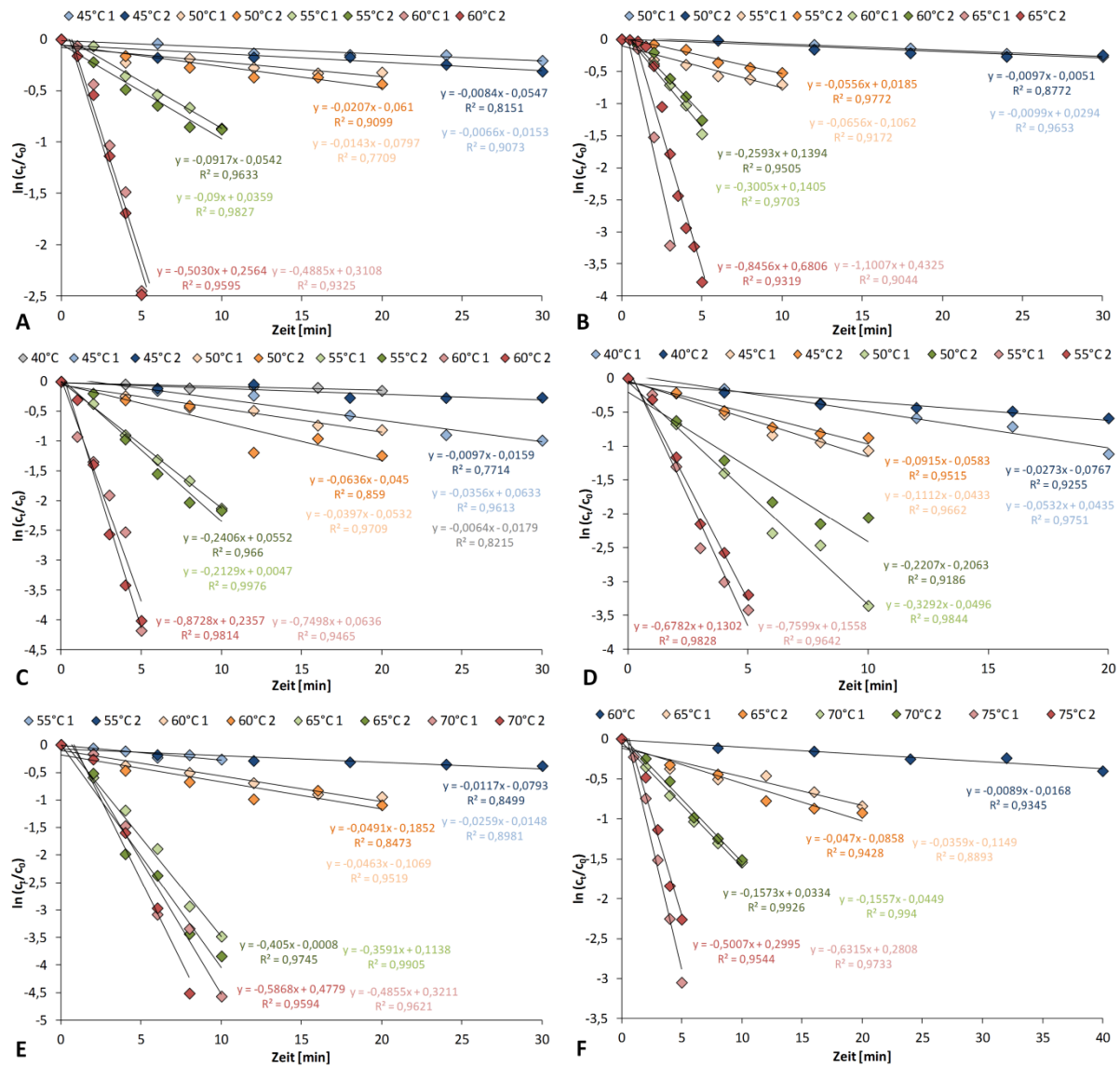
**Abbildung A.7-13:** Inaktivierungskinetik von  $\beta$ -Galactosidase aus *L. bulgaricus* LB4 (Rohextrakt) in 50 mmol/L Na-Phosphat-Puffer pH 6,0 (A), pH 6,5 (B), pH 7,0 (C) und pH 7,5 (D) sowie in Süßmolke (E, 39 g/L Lactose) und konz. Süßmolke (F, 200 g/L Lactose). Süßmolke rekonstituiert aus Pulver (Molkerei Meggle Wasserburg GmbH & Co. KG).



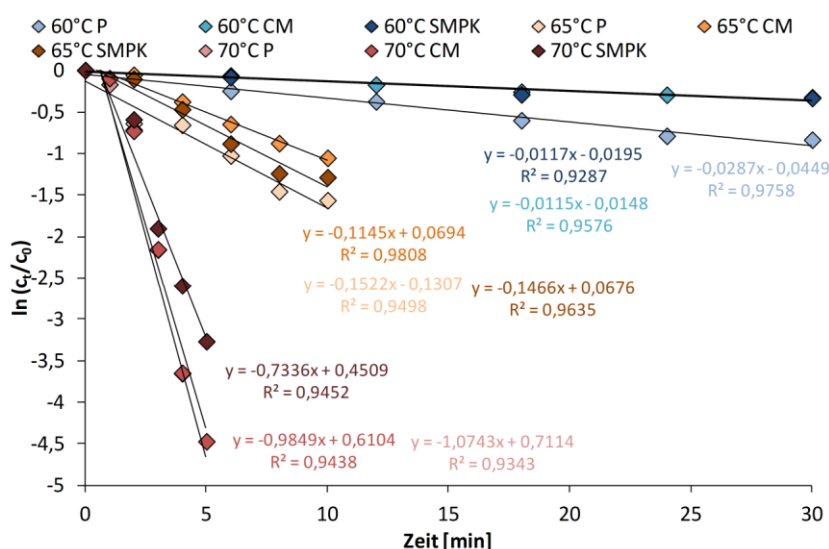
**Abbildung A.7-14:** Inaktivierungskinetik von  $\beta$ -Galactosidase aus *L. bulgaricus* LB8 (Rohextrakt) in 50 mmol/L Na-Phosphat-Puffer pH 6,0 (A), pH 6,5 (B), pH 7,0 (C) und pH 7,5 (D) sowie in Süßmolke (E, 39 g/L Lactose) und konz. Süßmolke (F, 200 g/L Lactose). Süßmolke rekonstituiert aus Pulver (Molkerei Meggle Wasserburg GmbH & Co. KG).



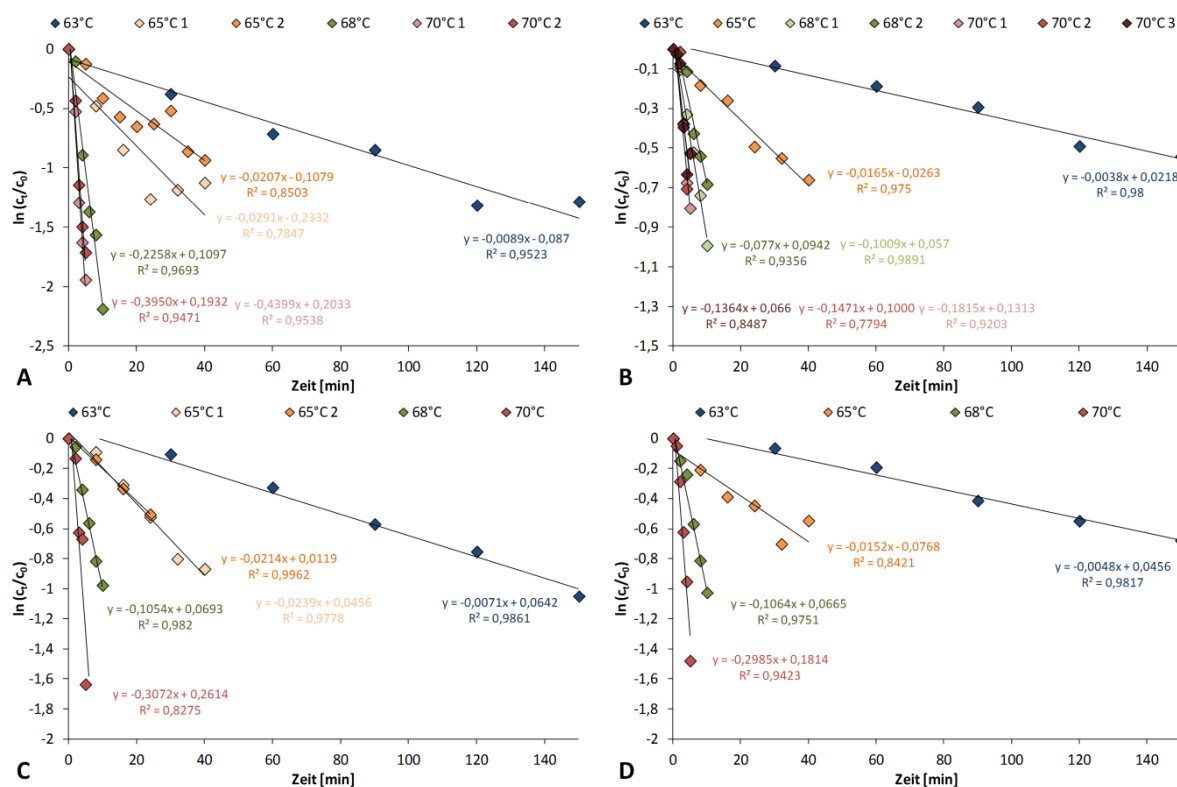
**Abbildung A.7-15:** Inaktivierungskinetik von  $\beta$ -Galactosidase aus *L. bulgaricus* SP5 (Rohextrakt) in 50 mmol/L Na-Phosphat-Puffer pH 6,0 (A), pH 6,5 (B), pH 7,0 (C) und pH 7,5 (D) sowie in Süßmolke (E, 39 g/L Lactose) und konz. Süßmolke (F, 200 g/L Lactose). Süßmolke rekonstituiert aus Pulver (Molkerei Meggle Wasserburg GmbH & Co. KG).



**Abbildung A.7-16:** Inaktivierungskinetik von  $\beta$ -Galactosidase aus *L. reuteri* LR92 (Rohextrakt) in 50 mmol/L Na-Phosphat-Puffer pH 6,0 (A), pH 6,5 (B), pH 7,0 (C) und pH 7,5 (D) sowie in Süßmolke (E, 39 g/L Lactose) und konz. Süßmolke (F, 200 g/L Lactose). Süßmolke rekonstituiert aus Pulver (Molkerei Meggle Wasserburg GmbH & Co. KG).

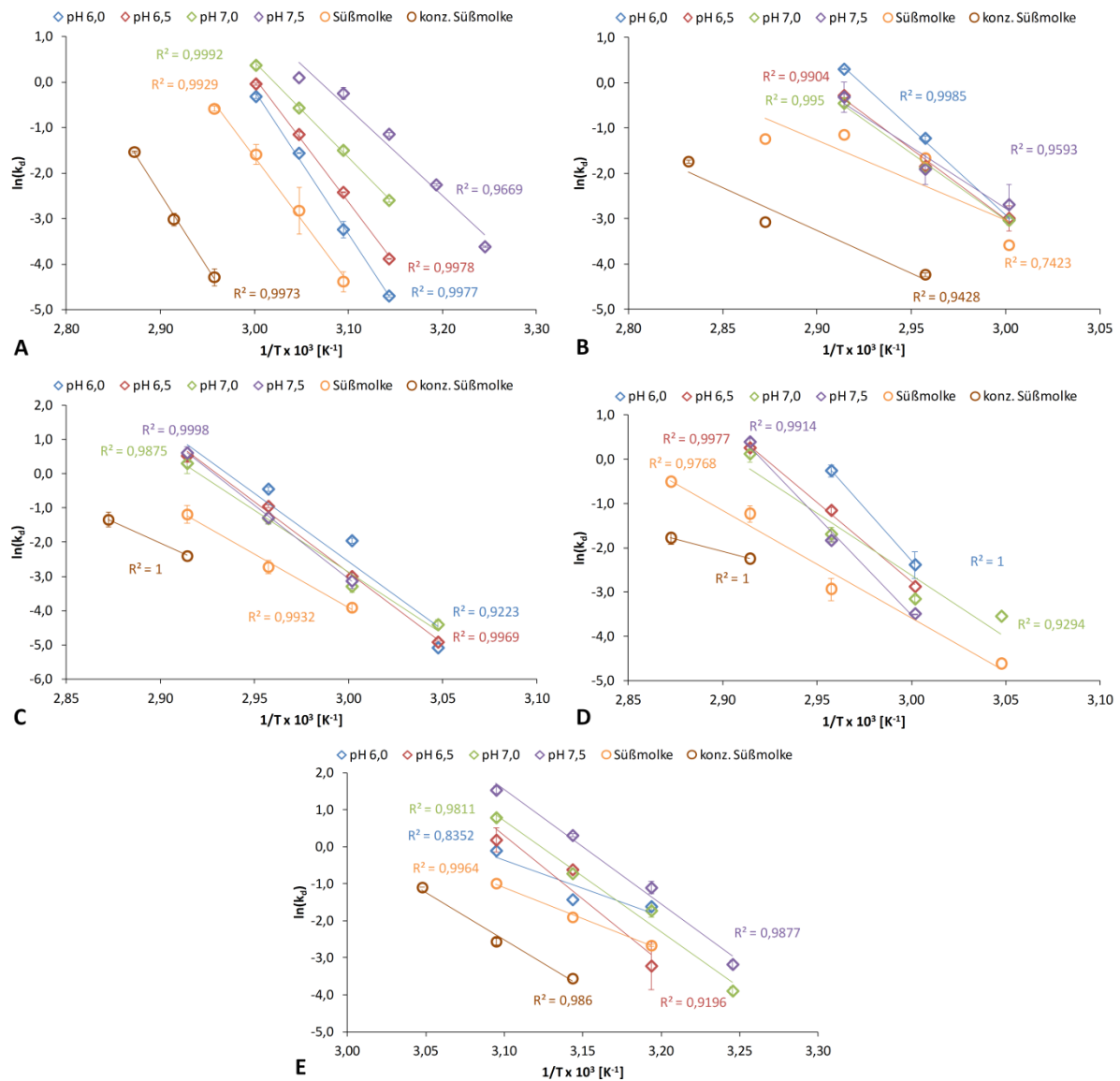


**Abbildung A.7-17:** Inaktivierungskinetik von  $\beta$ -Galactosidase aus *A. oryzae* (Maxilact A4) in 50 mmol/L Mcllvaine-Puffer pH 4,5 (P), Caseinmolke (CM) und Sauermolkenpermeat-Konzentrat (SMPK).

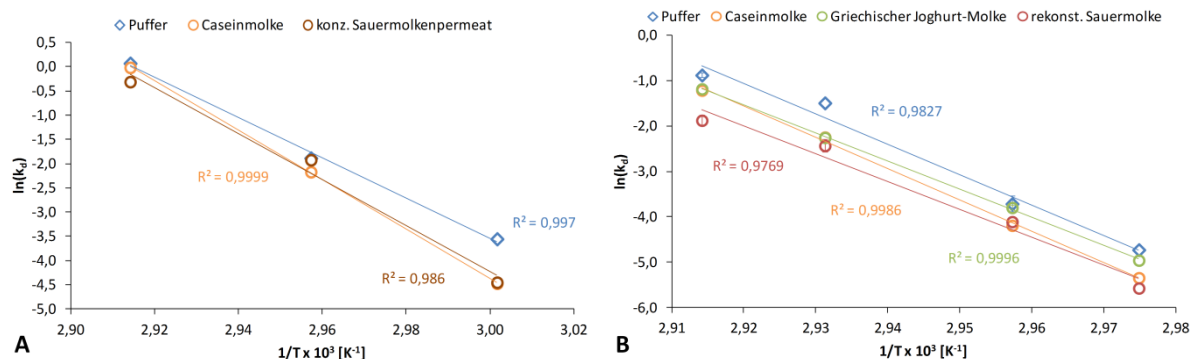


**Abbildung A.7-18:** Inaktivierungskinetik von  $\beta$ -Galactosidase aus *C. laurentii* (ganze Zellen) in 50 mmol/L Mcllvaine-Puffer pH 4,5 (A), rekonstituierter Sauermolke (B, mit Pulver von Euroduna Food Ingredients GmbH), Griechischer Joghurt-Molke (C) und Caseinmolke (D).

## Arrhenius-Diagramme der Enzyminaktivierung:



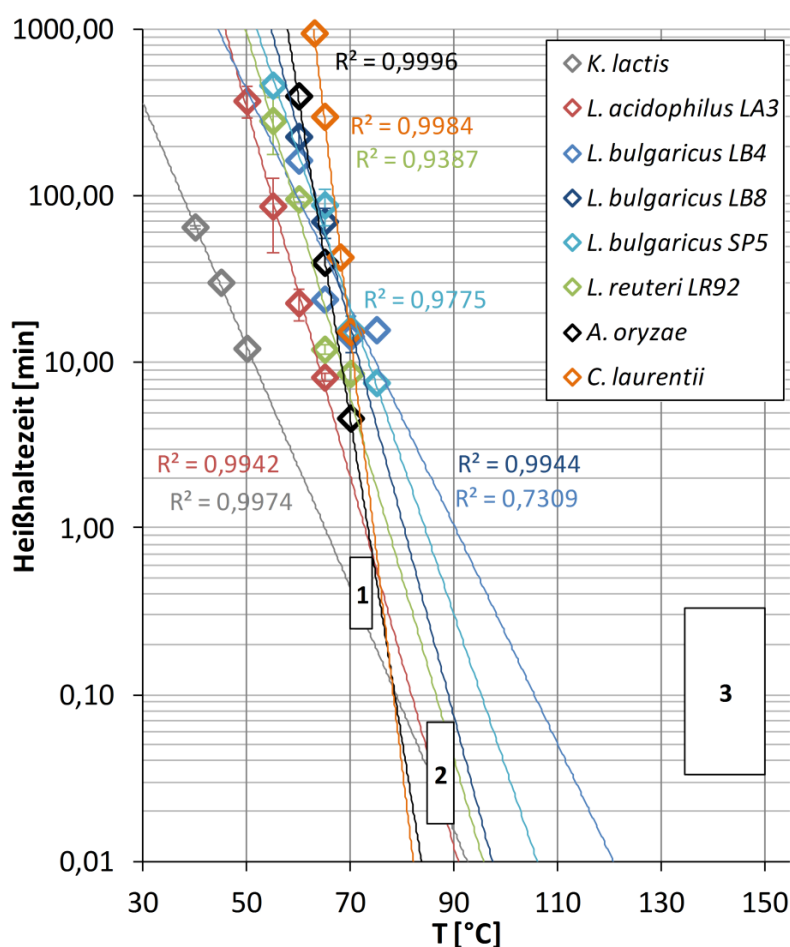
**Abbildung A.7-19:** Arrhenius-Diagramme der  $\beta$ -Galactosidase-Inaktivierung in 50 mmol/L Na-Phosphat-Puffer (pH 6,0–7,0), Süßmolke (39 g/L Lactose) und konzentrierter Süßmolke (200 g/L Lactose). A: *L. acidophilus* LA3. B: *L. bulgaricus* LB4. C: *L. bulgaricus* LB8. D: *L. bulgaricus* SP5. E: *K. lactis* (optilactase LX2). Süßmolke rekonstituiert aus Pulver (Molkerei Meggle Wasserburg GmbH & Co. KG).



**Abbildung A.7-20:** Arrhenius-Diagramme der  $\beta$ -Galactosidase-Inaktivierung in 50 mmol/L McIlvaine-Puffer pH 4,5 und verschiedenen Arten von Sauermolke. A: *A. oryzae* (Maxilact A4). B: *C. laurentii* (ganze Zellen). Modifizierte Version dieser Abbildung publiziert als Fig. 3 in [CF1].

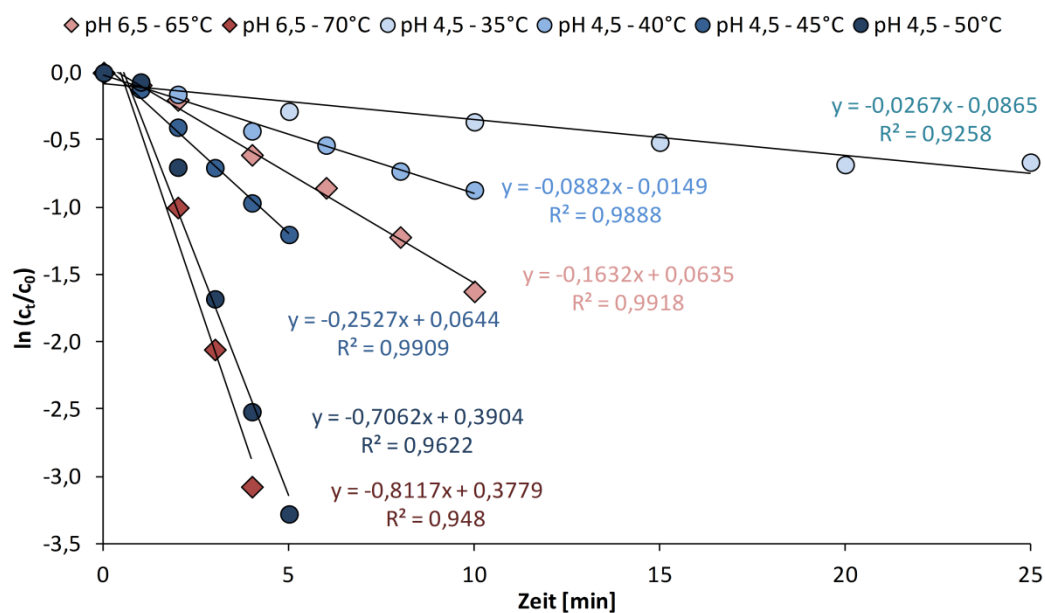
Linien gleichen Effekts zur 99 %-igen Enzyminaktivierung in Molke:

Berechnung über  $t = D \times \log \frac{c_0}{c}$  mit  $c_0$  = Ausgangskonzentration,  $c$  = Konzentration nach Erhitzung



**Abbildung A.7-21:** Linien gleichen Effekts zur 99 %-igen  $\beta$ -Galactosidase-Inaktivierung in Süßmolke (für *K. lactis* und *Lactobacillus* sp.) und Caseinmolke (für *A. oryzae* und *C. laurentii*). Bereiche: 1 = Kurzzeiterhitzung, 2 = Hoherhitzung, 3 = UHT-Erhitzung (Daten aus [320]).

### 7.3.4 Katalase-Stabilität



**Abbildung A.7-22:** Inaktivierungskinetik von Katalase aus *Micrococcus lysodeikticus* in PEM-Puffer pH 6,5 (rot) und Na-Acetat-Puffer pH 4,5 (blau).

**Tabelle A.7-12:** Halbwertszeiten ( $t_{1/2}$ ) von Katalase in Abhängigkeit von pH und Temperatur.

Puffer	pH	T [°C]	$t_{1/2}$ [min]
PEM	6,5	70	0,9
PEM	6,5	65	4,2
Na-Acetat	4,5	50	1,0
Na-Acetat	4,5	45	2,7
Na-Acetat	4,5	40	7,9
Na-Acetat	4,5	35	21,7

Tabelle publiziert in modifizierter Form als Tab. S1 (supplemental data) in [CF2].



### 7.3.5 Aminosäuresequenz von $\beta$ -Galactosidase aus *L. bulgaricus* LB4

Die Sequenzierung der  $\beta$ -Galactosidase aus *Lactobacillus bulgaricus* LB4 erfolgte extern an der Universität Halle. Die erhaltene Sequenz (folgende genannt „Sequenz1“) wurde auf [www.uniprot.org](http://www.uniprot.org) mit der Sequenz von  $\beta$ -Galactosidase aus *Lactobacillus bulgaricus* ATCC 11842 (Kürzel BGAL\_LACDA) verglichen. Beide Sequenzen stimmen zu 100 % überein:

```
Sequenz1      MSNKLVKEKRVDAQADLAWLTDPEVYEVNTIPPHSDHESFQSQEELEEGKSSLVQSLDGDW 60
SP|Q1G9Z4|BGAL_LACDA MSNKLVKEKRVDAQADLAWLTDPEVYEVNTIPPHSDHESFQSQEELEEGKSSLVQSLDGDW 60
*****

Sequenz1      LIDYAENGQGPVNFYAEDFDDSNFKSVKVPGNLELQGFQGPQYVNVQYPWDGSEEIFPPQ 120
SP|Q1G9Z4|BGAL_LACDA LIDYAENGQGPVNFYAEDFDDSNFKSVKVPGNLELQGFQGPQYVNVQYPWDGSEEIFPPQ 120
*****

Sequenz1      IPSKNPLASYVRYFDLDEAFWDKEVSLKFDGAATAIYVWLNHGFVGYGEDSFTPFSEFMT 180
SP|Q1G9Z4|BGAL_LACDA IPSKNPLASYVRYFDLDEAFWDKEVSLKFDGAATAIYVWLNHGFVGYGEDSFTPFSEFMT 180
*****

Sequenz1      KFLKKENRLAVALYKYSSASWLEDQDFWRMSGFLRSVTLQAKPRLHLEDLKLTA SLTDN 240
SP|Q1G9Z4|BGAL_LACDA KFLKKENRLAVALYKYSSASWLEDQDFWRMSGFLRSVTLQAKPRLHLEDLKLTA SLTDN 240
*****

Sequenz1      YQKGKLEVEANIAIYRLPNASFKEVRDSEGDVLAEKLGPIRSEQLEFTLADLPVAAWSAE 300
SP|Q1G9Z4|BGAL_LACDA YQKGKLEVEANIAIYRLPNASFKEVRDSEGDVLAEKLGPIRSEQLEFTLADLPVAAWSAE 300
*****

Sequenz1      KPNLYQVRLYLQYAGSLEVSQRQEVGFRNFELKDGIMYLNQQRIVFKGANRHEFDSKLGR 360
SP|Q1G9Z4|BGAL_LACDA KPNLYQVRLYLQYAGSLEVSQRQEVGFRNFELKDGIMYLNQQRIVFKGANRHEFDSKLGR 360
*****

Sequenz1      AITEEDMIWDIKTMKRSNINAVRCSHYPNQSLFYRLCDKYGLYVIDEANLESHGTWEKVG 420
SP|Q1G9Z4|BGAL_LACDA AITEEDMIWDIKTMKRSNINAVRCSHYPNQSLFYRLCDKYGLYVIDEANLESHGTWEKVG 420
*****

Sequenz1      GHEDPSFNVPGDQDQHWLGASLSRVKNMMDKNDKNHASILIWSLGNESYAGTVFAQMADYVR 480
SP|Q1G9Z4|BGAL_LACDA GHEDPSFNVPGDQDQHWLGASLSRVKNMMDKNDKNHASILIWSLGNESYAGTVFAQMADYVR 480
*****

Sequenz1      KADPTRVQHYEGVTHNRKFDDATQIESRMYAPAKVIEEYLTNKPAPKPFISVEYAHAMGNS 540
SP|Q1G9Z4|BGAL_LACDA KADPTRVQHYEGVTHNRKFDDATQIESRMYAPAKVIEEYLTNKPAPKPFISVEYAHAMGNS 540
*****

Sequenz1      VGDLAAYTALEKYPHYQGGFIWDWIDQGLEKDGHLHYGGDFDDRPTDYEF CGNGLVFADR 600
SP|Q1G9Z4|BGAL_LACDA VGDLAAYTALEKYPHYQGGFIWDWIDQGLEKDGHLHYGGDFDDRPTDYEF CGNGLVFADR 600
*****

Sequenz1      TESPPLANVKALYANLKLEVKDQGLFLKNDNLFTNSSSYFLTSLLDVGKLTYSRPLTF 660
SP|Q1G9Z4|BGAL_LACDA TESPPLANVKALYANLKLEVKDQGLFLKNDNLFTNSSSYFLTSLLDVGKLTYSRPLTF 660
*****

Sequenz1      GLEPGESGTFALPWPEVADEKGEVYRVTAHLKEDLPWADEGFTVAEAEVAQKLPEFKP 720
SP|Q1G9Z4|BGAL_LACDA GLEPGESGTFALPWPEVADEKGEVYRVTAHLKEDLPWADEGFTVAEAEVAQKLPEFKP 720
*****

Sequenz1      EGRPDLVDSYDNLGLKGNNFQILFSKVKGWVPSLKYAGREYLRKLPFTFWRALTDNDRG 780
SP|Q1G9Z4|BGAL_LACDA EGRPDLVDSYDNLGLKGNNFQILFSKVKGWVPSLKYAGREYLRKLPFTFWRALTDNDRG 780
*****

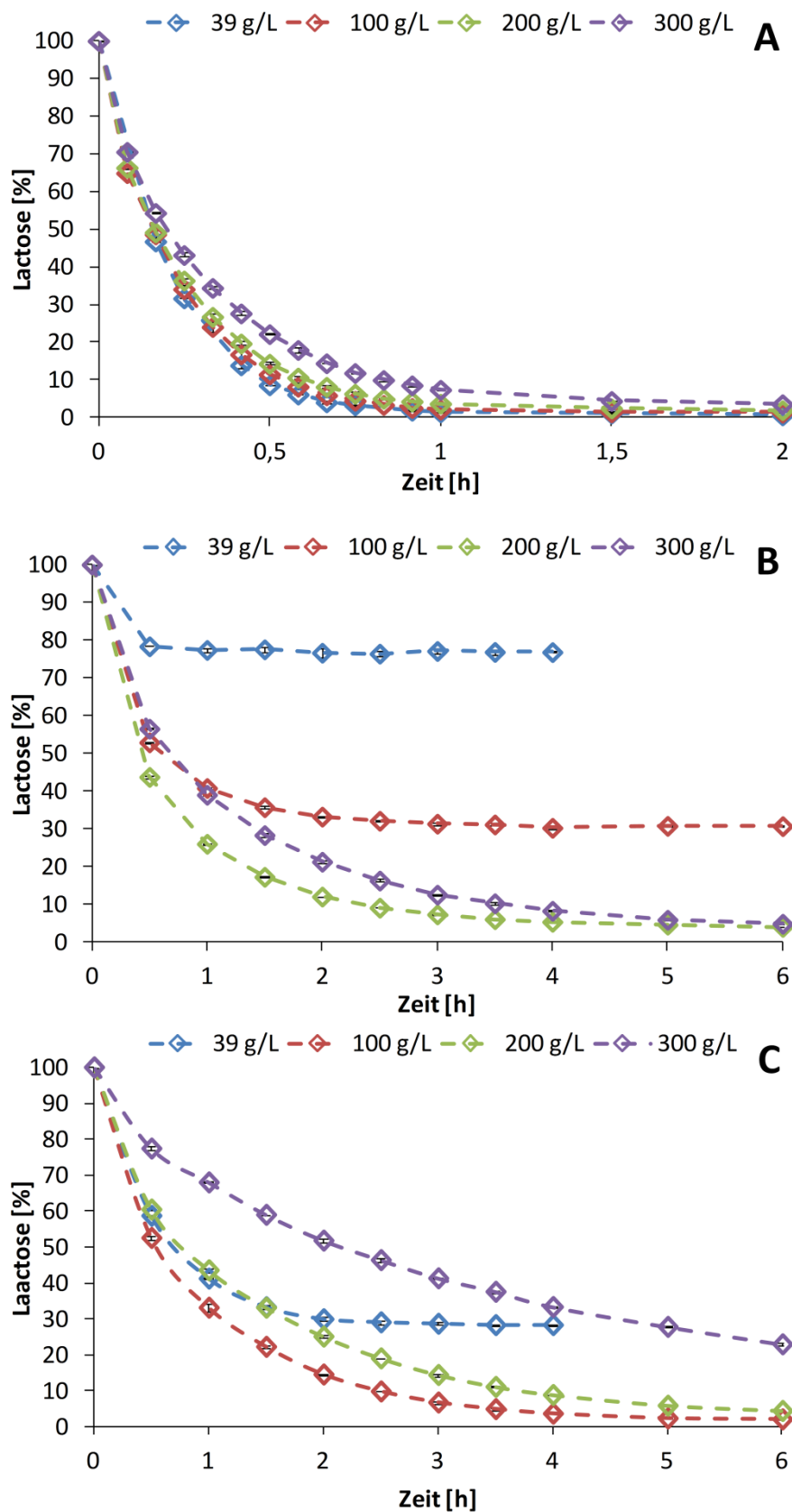
Sequenz1      AGYGYDLARWENAGKYARLKDISEVKEDSVLVKTAFTLPVALKGDLTVTYEVDGRGKIA 840
SP|Q1G9Z4|BGAL_LACDA AGYGYDLARWENAGKYARLKDISEVKEDSVLVKTAFTLPVALKGDLTVTYEVDGRGKIA 840
*****

Sequenz1      VTADFPGAEEAGLLPAFGLNLALPKELTDYRYYGLGPNESYPDRLEGNYLGIYQGA VKKN 900
SP|Q1G9Z4|BGAL_LACDA VTADFPGAEEAGLLPAFGLNLALPKELTDYRYYGLGPNESYPDRLEGNYLGIYQGA VKKN 900
*****

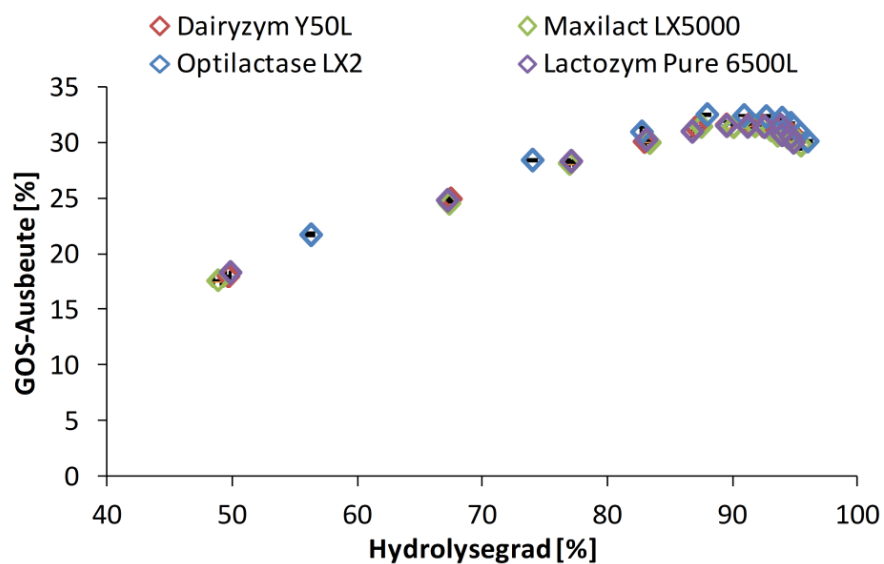
Sequenz1      FSPYLRPQETGNRSKVRWYQLFDEKGGLEFTANGADLNL SALPYSAAQIEAADHAFELTN 960
SP|Q1G9Z4|BGAL_LACDA FSPYLRPQETGNRSKVRWYQLFDEKGGLEFTANGADLNL SALPYSAAQIEAADHAFELTN 960
*****

Sequenz1      NYTWVRALSAQMGVGGDDSWGQKVHPEFCLDAQKARQLRLVIQPLLLK 1008
SP|Q1G9Z4|BGAL_LACDA NYTWVRALSAQMGVGGDDSWGQKVHPEFCLDAQKARQLRLVIQPLLLK 1008
*****
```

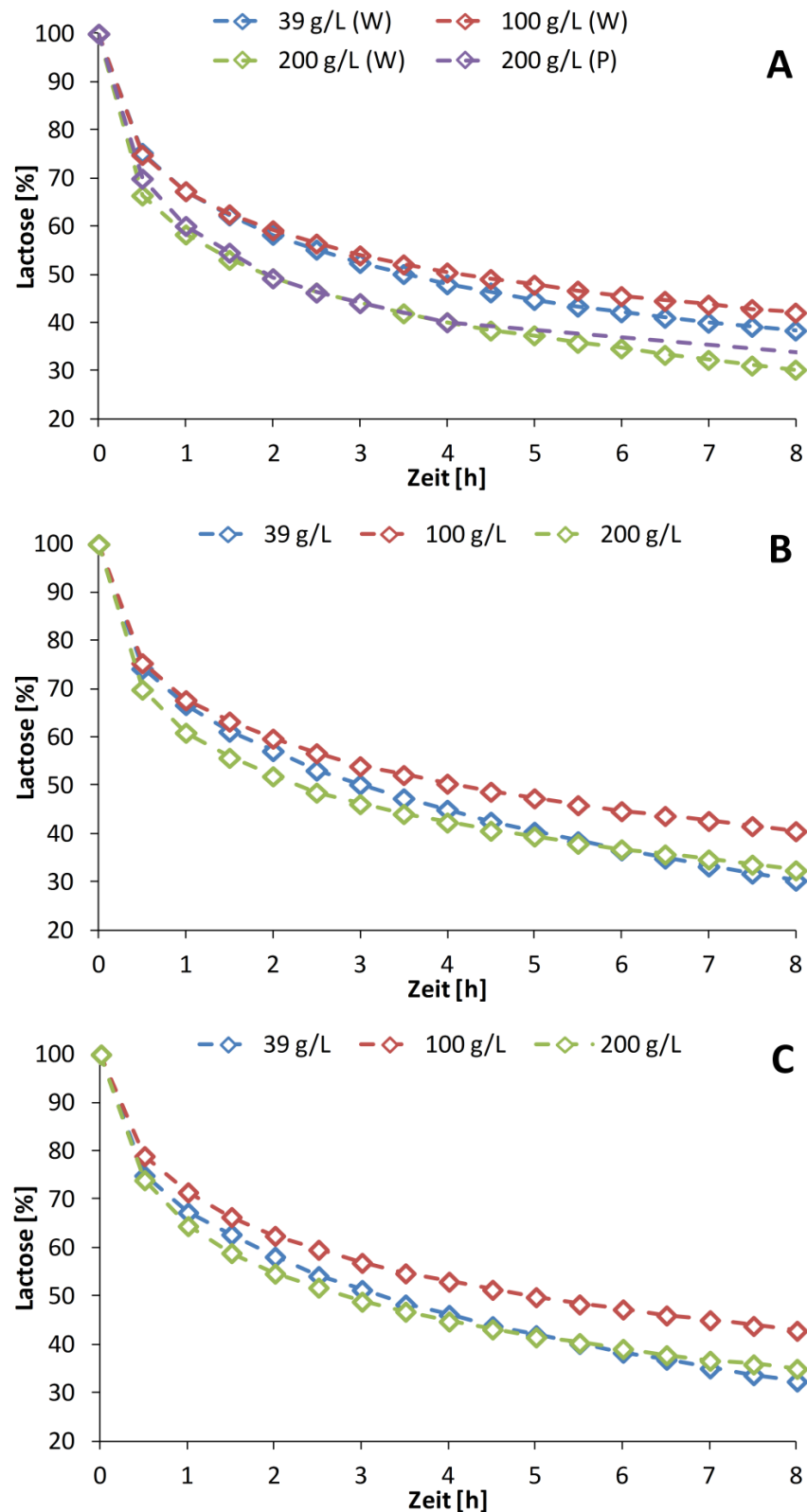
### 7.3.6 Grafiken zur GOS-Synthese mit kommerziellen $\beta$ -Galactosidasen



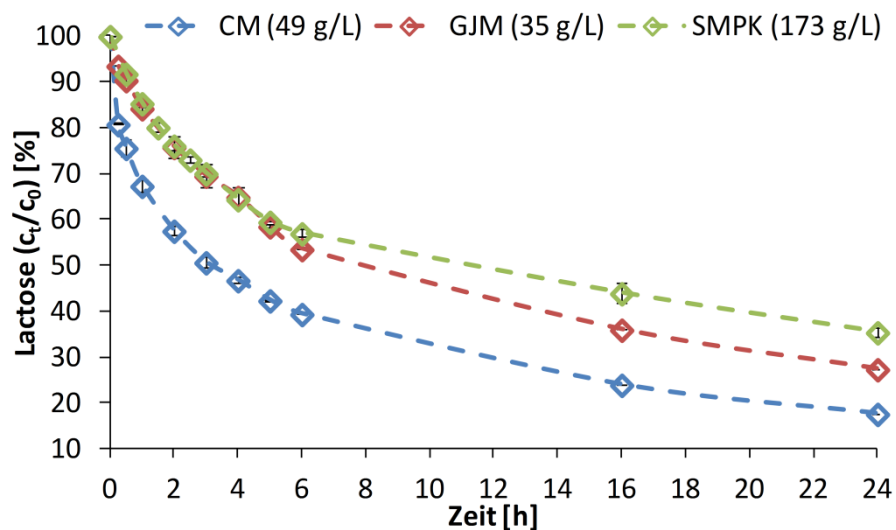
**Abbildung A.7-23:** Lactoseabbau während der GOS-Synthese mit *K. lactis* (optilactase LX2) in PEM-Puffer (A), Süßmolke (B) und Sauermolke (C). Reaktionsbedingungen: pH 6,5, 45°C, 50 U/g, n =2. Legende gibt die ILC (gerundet) wieder, tatsächliche Werte siehe Tabelle A.7-8.



**Abbildung A.7-24:** GOS-Ausbeute in konzentrierter Süßmolke (200 g/L ILC) in Abhängigkeit vom Lactoseumsatz mit verschiedenen  $\beta$ -Galactosidase-Präparaten aus *K. lactis*. Reaktionsbedingungen: pH 6,5, 45°C, 50 U/g, n =2. Süßmolke rekonstituiert aus Pulver (Molkerei Meggle Wasserburg GmbH & Co. KG). Publiziert in modifizierter Form als Fig. 6 in [CF5].

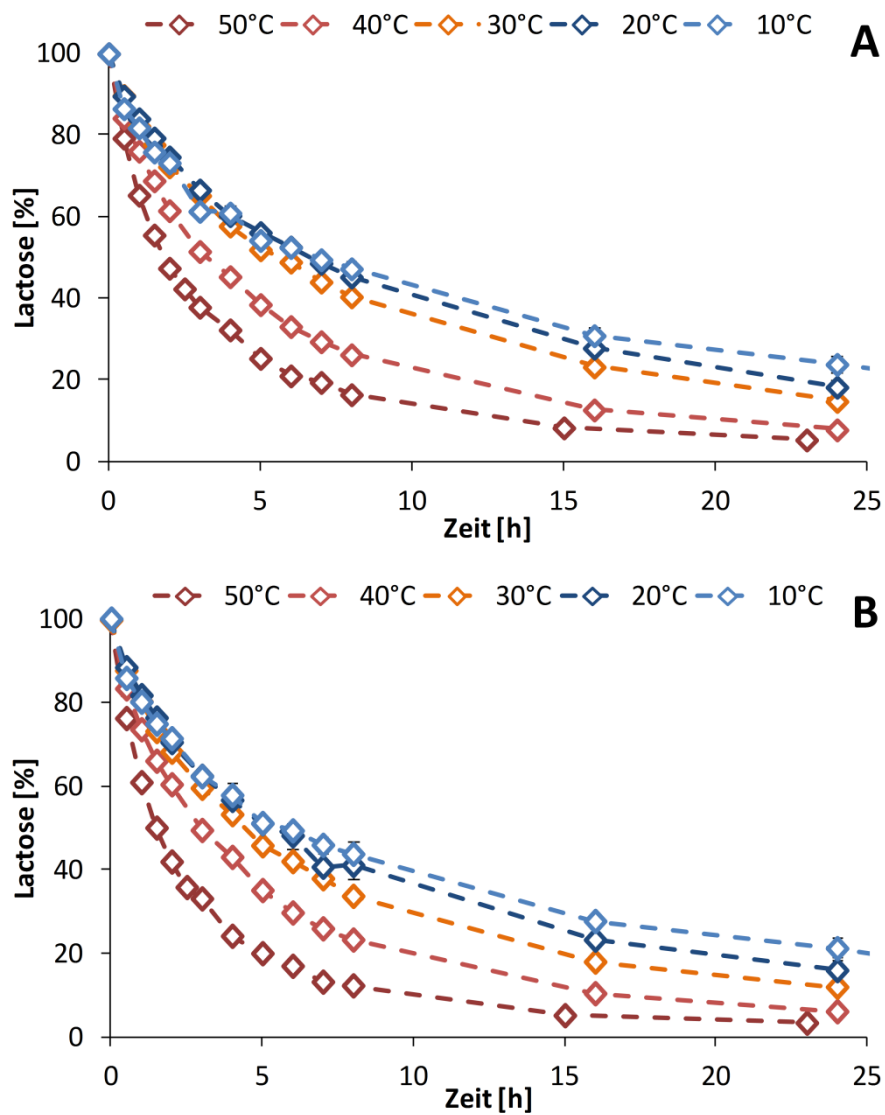


**Abbildung A.7-25:** Lactoseabbau während der GOS-Synthese mit *A. oryzae* in deion. Wasser (W, optilactase A50) bzw. McIlvaine-Puffer (P, Maxilact A4) (A), Süßmolke (B) und Sauermolke (C). Reaktionsbedingungen: pH 4,5, 55°C, 50 U/g, n = 2 (W), n = 1 (P). Legende gibt die ILC (gerundet) wieder, tatsächliche Werte siehe Tabelle A.7-8. Analytik nur auf der Hi-Plex Na-Säule für ILC = 100 g/L, d. h. die angegebene Restlactosekonzentration enthält auch GOS-Disaccharide. Demzufolge ist der Abbau scheinbar langsamer.

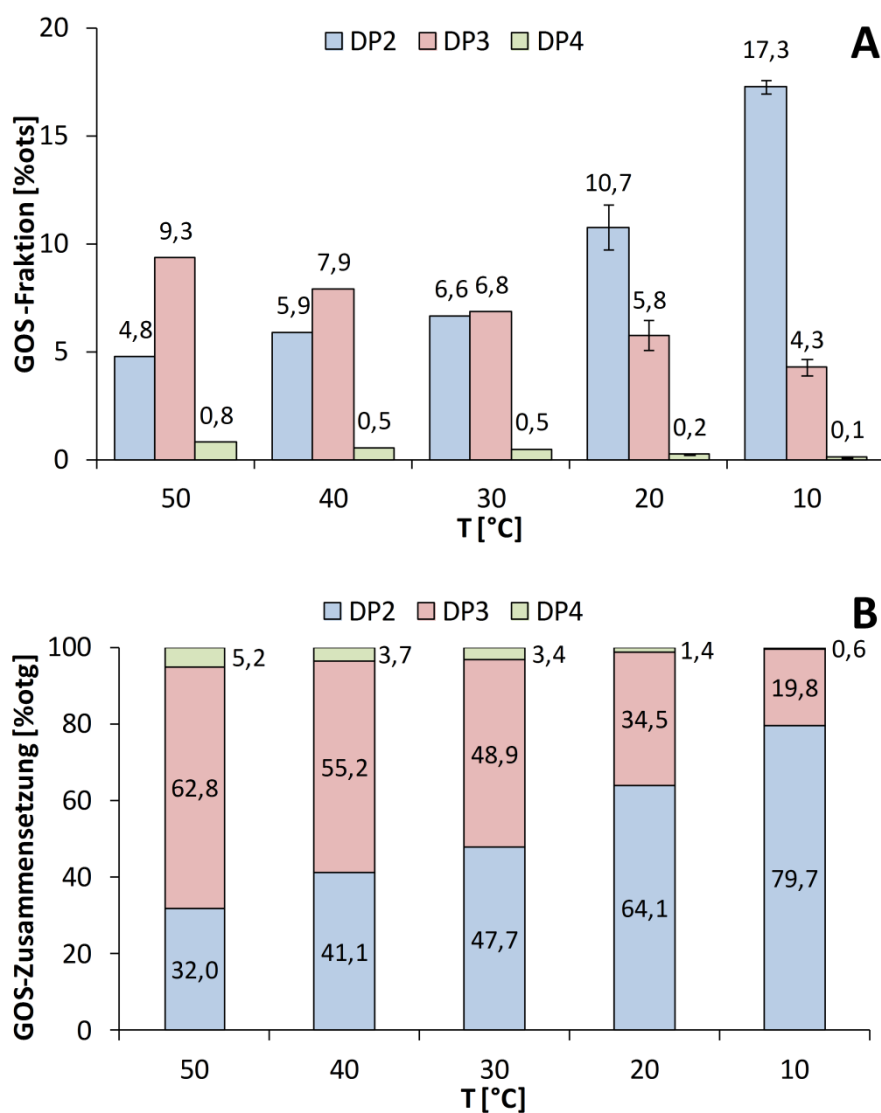


**Abbildung A.7-26:** Lactoseabbau während der GOS-Synthese mit *A. oryzae* (Maxilact A4) in verschiedenen Sauermolke-Proben (CM = Caseinmolke, GJM = Griechische Joghurt-Molke, SMPK = Sauermolkenpermeat-Konzentrat). Reaktionsbedingungen: 55°C, 50 U/g, n = 2. Angabe der ILC in Klammern bezieht sich auf die tatsächliche Konzentration nach Zugabe der Enzymlösung. Analytik nur auf der Hi-Plex Na-Säule, d. h. die angegebene Restlactosekonzentration enthält auch GOS-Disaccharide.

### 7.3.7 Grafiken zur GOS-Synthese mit $\beta$ -Galactosidase aus *L. bulgaricus* LB4



**Abbildung A.7-27:** Lactoseabbau während der GOS-Synthese mit *L. bulgaricus* LB4 in Puffer (A) und Süßmolke (B). Analytik nur auf der Hi-Plex Na-Säule, d. h. die angegebene Restlactosekonzentration kann weitere GOS-Disaccharide enthalten.



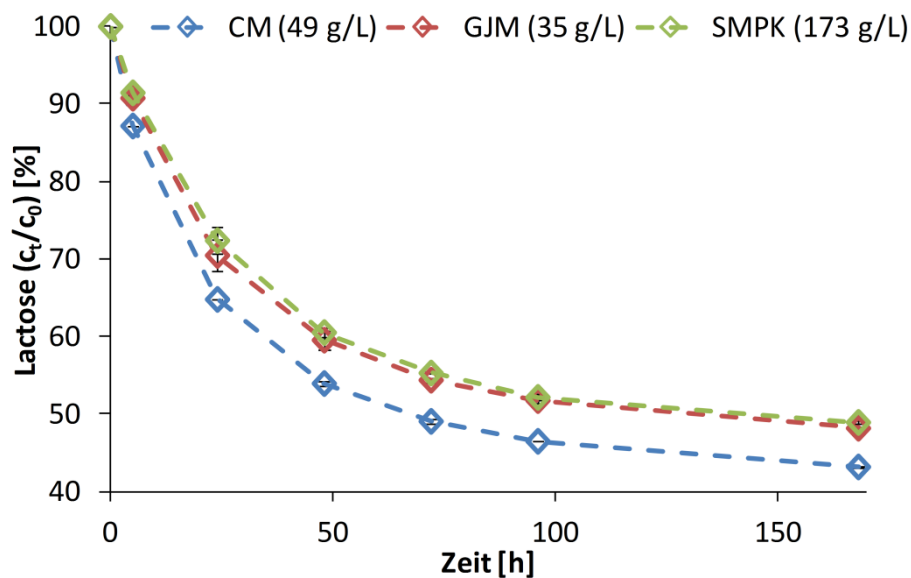
**Abbildung A.7-28:** Menge der von *L. bulgaricus* LB4 gebildeten GOS-Fractionen DP2, DP3 und DP4 (A, % der Gesamtzucker) und Anteil der Fractionen an den Gesamt-GOS (B) in Abhängigkeit von der Synthesetemperatur. Reaktionsbedingungen: ILC 45 g/L, Süßmolke pH 6,5, 30 U/g, n= 2 für 10°C und 20°C, n = 1 für 30–50°C, DP = Polymerisationsgrad.

### 7.3.8 Daten zur GOS-Synthese mit *β*-Galactosidase aus *C. laurentii*

**Tabelle A.7-13:** Zusammensetzung der GOS-Fraktion in % der Gesamt-GOS bei der Synthese mit *C. laurentii* in 50 mmol/L McIlvaine-Puffer zum Zeitpunkt der maximalen Ausbeute.\*

ILC [g/L]	GOS-Zusammensetzung <sup>a</sup> [%otg]		
	DP3	DP4	DP5
40	78,3 ± 0,0	20,3 ± 0,1	1,4 ± 0,1
100	77,1	21,4	1,6
200	81,7 ± 2,9	17,3 ± 2,6	1,0 ± 0,3

<sup>a</sup> Analytik nur auf der Hi Plex-Na-Säule. Durch Rundung Abweichung von 100 % möglich. DP = Polymerisationsgrad. n = 2 für 40 g/L und 200 g/L, n = 1 für 100 g/L. \* Werte in einer Zeile mit unterschiedlichem Exponent unterscheiden sich signifikant (Tukey-Kramer-Test,  $\alpha = 0,05$ ).



**Abbildung A.7-29:** Lactoseabbau während der GOS-Synthese mit *C. laurentii* (ganze Zellen) in verschiedenen Sauermolke-Proben (CM = Caseinmolke, GJM = Griechische Joghurt-Molke, SMPK = Sauermolkenpermeat-Konzentrat). Reaktionsbedingungen: 55°C, 1 U/g, n = 2. Angabe der ILC in Klammern bezieht sich auf die tatsächliche Konzentration nach Zugabe der Enzymlösung. Analytik nur auf der Hi-Plex Na-Säule, d. h. die angegebene Restlactosekonzentration enthält auch GOS-Disaccharide.



### 7.3.9 Vergleich der maximalen GOS-Ausbeute in Puffer und Molke

**Tabelle A. 7-14:** Maximale GOS-Ausbeute in Puffer, Süßmolke, verschiedenen Arten von Sauermolke sowie Süß- und Sauermolkenkonzentraten in Abhängigkeit von der verwendeten Enzymquelle\*, n. b. = nicht bestimmt.

Medium	ILC [g/L] <sup>a</sup>	maximale GOS-Ausbeute [%]			
		<i>K. lactis</i>	<i>A. oryzae</i>	<i>L. bulgaricus</i> (10°C)	<i>C. laurentii</i>
Puffer <sup>b</sup>	38-45	10,9 <sup>h</sup> ± 0,3 <sup>C</sup>	10,9 <sup>d</sup> ± 0,0 <sup>C</sup>	22,7 <sup>a</sup> ± 0,2 <sup>B</sup>	35,1 <sup>ab</sup> ± 0,9 <sup>A</sup>
Puffer <sup>b</sup>	100	20,2 <sup>f</sup> ± 0,1 <sup>B</sup>	16,7 <sup>c</sup> ± 0,0 <sup>C</sup>	n. b.	38,6 <sup>abA</sup>
Puffer <sup>b</sup>	200	28,7 <sup>d</sup> ± 0,0 <sup>B</sup>	24,3 <sup>a</sup> ± 0,2 <sup>C</sup>	n. b.	38,5 <sup>a</sup> ± 0,7 <sup>A</sup>
Puffer <sup>b</sup>	300	32,4 <sup>c</sup> ± 0,0	n. b.	n. b.	n. b.
Süßmolke <sup>c</sup>	38-45	4,3 <sup>i</sup> ± 0,2 <sup>C</sup>	10,9 <sup>d</sup> ± 0,2 <sup>B</sup>	21,7 <sup>b</sup> ± 0,1 <sup>A</sup>	n. b.
konz. Süßmolke <sup>c</sup>	100	18,4 <sup>g</sup> ± 0,4 <sup>A</sup>	17,2 <sup>c</sup> ± 0,0 <sup>A</sup>	n. b.	n. b.
konz. Süßmolke <sup>c</sup>	200	32,6 <sup>c</sup> ± 0,1 <sup>A</sup>	24,9 <sup>a</sup> ± 0,1 <sup>B</sup>	n. b.	n. b.
konz. Süßmolke <sup>c</sup>	300	36,5 <sup>a</sup> ± 0,0	n. b.	n. b.	n. b.
Sauermolke <sup>d</sup>	38	10,6 <sup>h</sup> ± 0,4 <sup>A</sup>	11,2 <sup>d</sup> ± 0,0 <sup>A</sup>	n. b.	n. b.
konz. Sauermolke <sup>d</sup>	100	23,3 <sup>e</sup> ± 0,2 <sup>A</sup>	16,5 <sup>c</sup> ± 0,1 <sup>B</sup>	n. b.	n. b.
konz. Sauermolke <sup>d</sup>	200	33,5 <sup>bc</sup> ± 0,3 <sup>A</sup>	24,5 <sup>a</sup> ± 0,3 <sup>B</sup>	n. b.	n. b.
konz. Sauermolke <sup>d</sup>	300	33,8 <sup>b</sup> ± 0,1	n. b.	n. b.	n. b.
Caseinmolke	49	n. b.	11,2 <sup>d</sup> ± 0,1 <sup>B</sup>	n. b.	35,4 <sup>ab</sup> ± 0,3 <sup>A</sup>
GJ-Molke <sup>e</sup>	35	n. b.	8,8 <sup>e</sup> ± 0,0 <sup>B</sup>	n. b.	34,6 <sup>b</sup> ± 0,4 <sup>A</sup>
konz. SMP <sup>f</sup>	173	n. b.	19,5 <sup>b</sup> ± 0,1 <sup>B</sup>	n. b.	36,1 <sup>ab</sup> ± 0,6 <sup>A</sup>

<sup>a</sup> nach Verdünnung durch die Enzymlösung.

<sup>b</sup> PEM-Puffer für *K. lactis*, deion. Wasser für *A. oryzae*, Na-Phosphat-Puffer für *L. bulgaricus*, McIlvaine-Puffer für *C. laurentii*.

<sup>c</sup> Süßmolke rekonstituiert aus Pulver (Molkerei Meggle Wasserburg GmbH & Co. KG für *K. lactis* und *A. oryzae*, Milchwerke "Mittelbe" GmbH für *L. bulgaricus*).

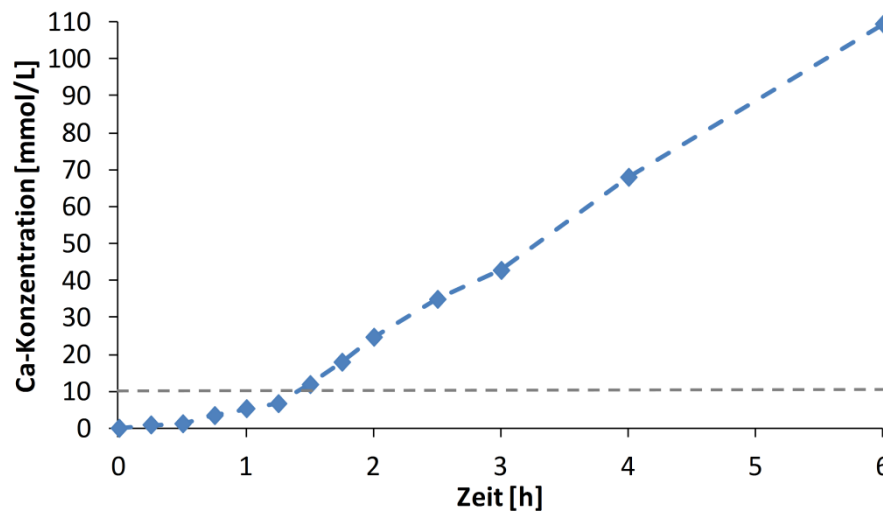
<sup>d</sup> Sauermolke rekonstituiert aus Pulver (Euroduna Food Ingredients GmbH).

<sup>e</sup> Griechische Joghurt-Molke.

<sup>f</sup> konzentriertes Sauermolkenpermeat.

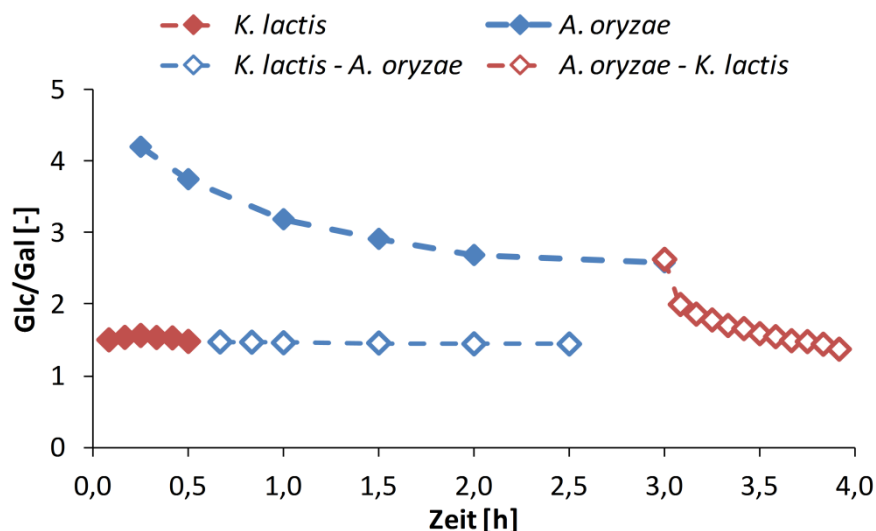
\* Werte mit unterschiedlichem Exponent (Spalte: Kleinbuchstaben, Zeile: Großbuchstaben) unterscheiden sich signifikant (Tukey-Kramer-Test, α = 0,05).

### 7.3.10 Grafik zur GOS-Synthese mit $\beta$ -Galactosidase/GOX/KAT

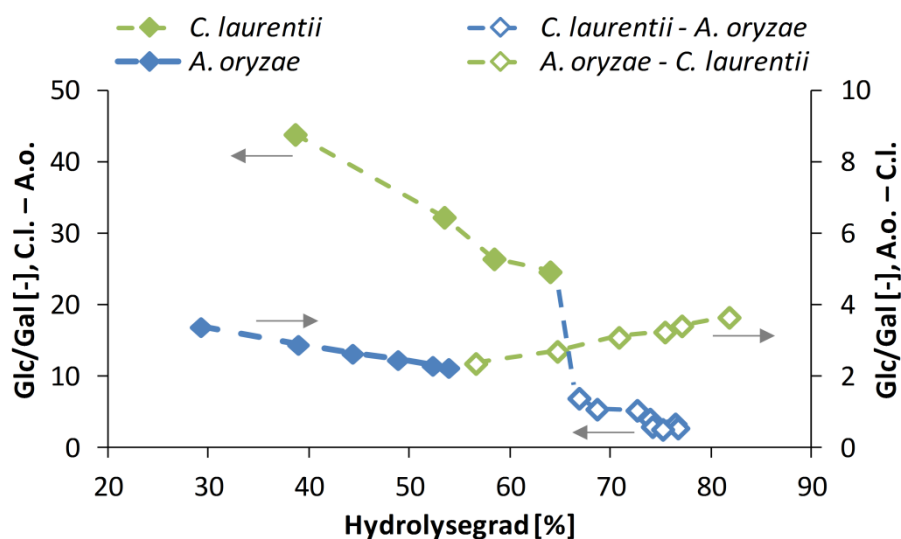


**Abbildung A.7-30:** Konzentration freier Calcium-Ionen während der GOS-Synthese mit  $\beta$ -Galactosidase aus *K. lactis*, Glucose-Oxidase und Katalase. 40 % (w/w)  $\text{CaCO}_3$  wurde während der ersten 45 min zudosiert, um den pH-Wert zu regeln. Bis zu einer Konzentration von 10 mmol/L (graue Linie) wurde keine Beeinflussung der oNPG-Enzymaktivität der  $\beta$ -Galactosidase (optilactase LX2) festgestellt (vgl. Tabelle A.7-10). Publiziert in modifizierter Form als Fig. S2 (supplemental data) in [CF2].

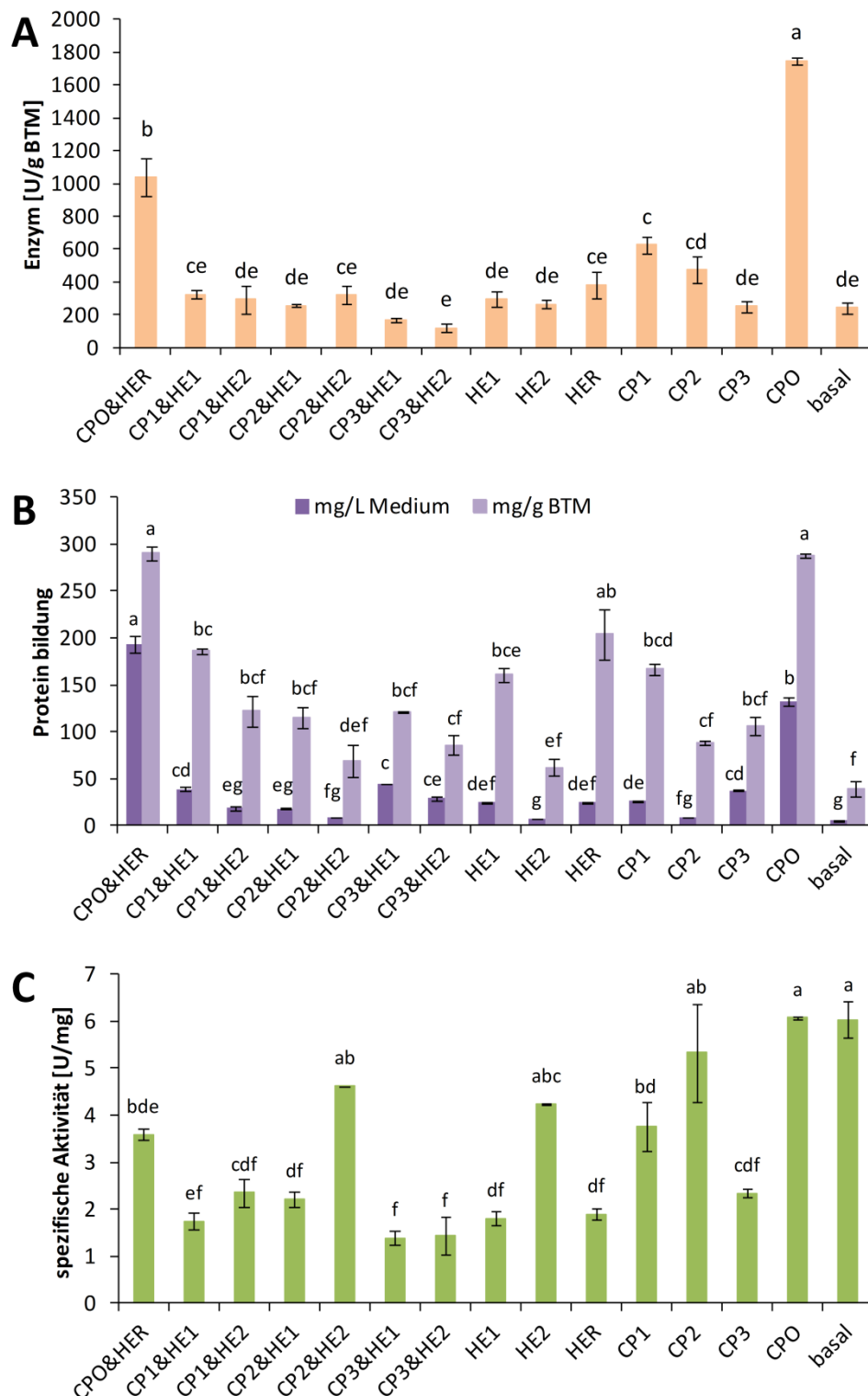
### 7.3.11 Grafiken zur GOS-Synthese mit mehreren $\beta$ -Galactosidasen



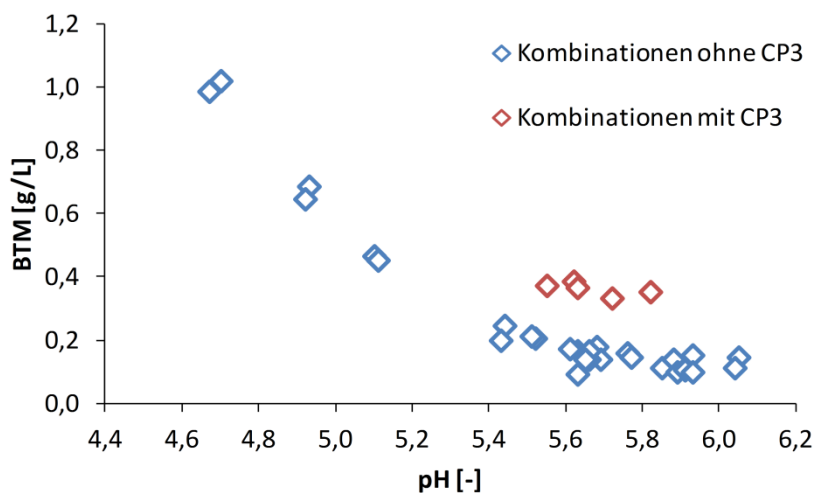
**Abbildung A.7-31:** Glc/Gal-Verhältnis während der GOS-Synthese mit *K. lactis* (optilactase LX2) und *A. oryzae* (Maxilact A4) sowie der sequentiellen Kombination von *K. lactis* und *A. oryzae* (Inaktivierung des jeweils ersten Enzyms).



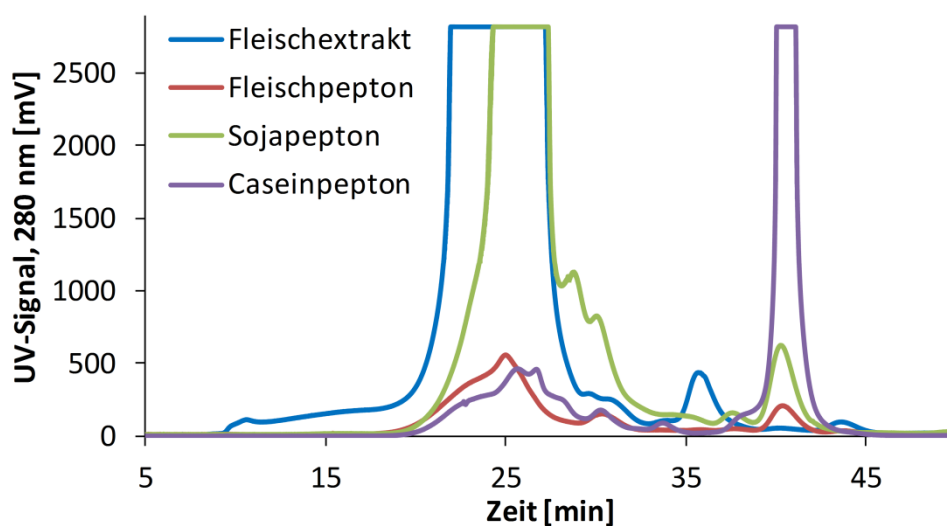
**Abbildung A.7-32:** Glc/Gal-Verhältnis während der GOS-Synthese mit *A. oryzae* (Maxilact A4) und *C. laurentii* sowie der sequentiellen Kombination von *A. oryzae* und *C. laurentii* (Inaktivierung des jeweils ersten Enzyms). Die Kombination *C. laurentii* – *A. oryzae* ist auf der linken, die Kombination *A. oryzae* – *C. laurentii* ist auf der rechten Achse dargestellt. Aufgrund der stark unterschiedlichen E/S-Verhältnisse wurde als Zeitachse der Hydrolysegrad gewählt.

7.3.12 Grafiken zur Kultivierung von *L. bulgaricus* LB4

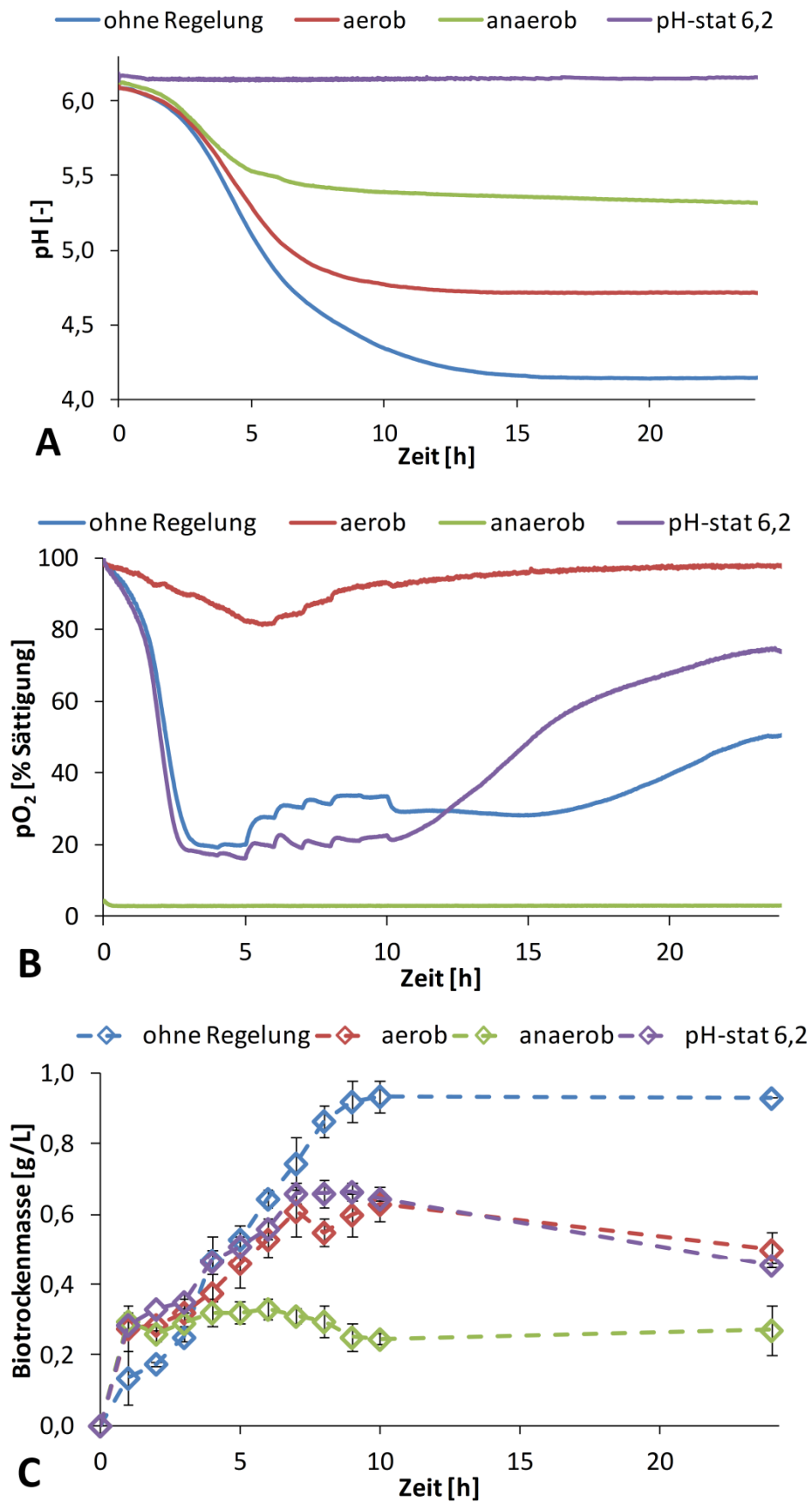
**Abbildung A.7-33:** Einfluss verschiedener Caseinpeptone (CP) und Hefeextrakte (HE) auf  $\beta$ -Galactosidase-Synthese (A), Proteinbildung (B) und spezifische Enzymaktivität (C) mit *L. bulgaricus* LB4, n = 2. Produktbezeichnungen: CPO = CP von Otto Nordwald, CP1 = CP von Organotechnie S.A.S., CP2 = CP von Solabia, CP3 = CP von TATUA/Sensient, HER = HE von Carl Roth, HE1 = HE von Bio Springer S.A., HE2 = HE von Ohly GmbH, basal = ohne CP, ohne HE. Unterschiedliche Buchstaben innerhalb einer Reihe implizieren Signifikanz (Tukey-HSD-Test,  $\alpha = 0,05$ ).



**Abbildung A.7-34:** Korrelation von Biotrockenmasse (BTM) und pH-Wert nach der Kultivierung (15 h) mit *L. bulgaricus* LB4. Legende: blau = alle CP/HE-Kombinationen, die nicht CP3 enthalten (12), rot = alle Kombinationen, die CP3 enthalten (3). CP = Caseinpepton, HE = Hefeextrakt.



**Abbildung A.7-35:** Größenanalyse der komplexen N-Quellen Fleischextrakt (Carl Roth), Fleischpepton (Sigma Aldrich), Sojapepton und Caseinpepton (beide von Otto Nordwald) mittels FPLC (Säule: Superose 12, Eluent: 50 mmol/L Na-Phosphat pH 6,2, je 0,2 g/mL. Aprotinin (6,5 kDa) eluiert nach ca. 24,5 min (nicht gezeigt).



**Abbildung A.7-36:** Verlauf von Medien-pH (A), Sauerstoffsättigung (B, 100 % entspricht einer Sättigung mit Luft) und Biotrockenmasse (C) bei der Kultivierung von *L. bulgaricus* LB4 unter verschiedenen Bedingungen in Caseinpepton-MRS-Medium bei 37°C. Caseinpepton von Otto Nordwald.